



Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Daniela Šupe-Domić

# **SALIVARNI BILJEZI STRESA U POPULACIJI MATURANATA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2017.



Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Daniela Šupe-Domić

# **SALIVARNI BILJEZI STRESA U POPULACIJI MATURANATA**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

Prof. dr. sc. Irena Drmić Hofman

Prof. dr. sc. Lada Rumora

Zagreb, 2017.



University of Zagreb

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Daniela Šupe-Domić

# **SALIVARY MARKERS OF STRESS IN UPPER SECONDARY SCHOOL SENIORS**

DOCTORAL THESIS

Supervisors:  
Irena Drmić Hofman, Ph.D.  
Lada Rumora, Ph.D.

Zagreb, 2017.

Istraživanja u okviru doktorskog rada provedena su kao dio znanstveno-istraživačkog projekta „Modernizacijski stres, mladi i migracije“ (09.01/408), voditeljice doc. dr. sc. Irene Martinović Klarić, kojeg je financirala Hrvatska zaklada za znanost.

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana medicinska biokemija.

## **ZAHVALA**

Želim izraziti zahvalnost i uputiti priznanje svima koji su mi tijekom izrade doktorske disertacije pružali potporu i korisne savjete:

- mentorici prof. dr. sc. Ireni Drmić Hofman za stručno praćenje i konstantnu dostupnost za diskusiju i kontakte
- mentorici prof. dr. sc. Ladi Rumori za nesebično poticanje i strpljivost kako na znanstvenoj tako i na pedagoškoj razini
- voditeljici projekta doc. dr. sc. Ireni Martinović Klarić što me upoznala sa projektom u okviru kojeg sam vršila istraživanje, te na stalnoj podršci i praćenju tijekom rada
- članovima projektnog tima za interdisciplinarni pristup istraživanoj problematici
- mojim roditeljima na strpljivosti i trajnoj podršci
- i mome suprugu za razumjevanje, nadasve mirnoću kao i informatičku podršku,

Veliko hvala svima.

## SAŽETAK

U fiziološkom odgovoru na stres i kontroli stresnog odgovora uglavnom sudjeluju dvije komponente neuroendokrinog sustava, simpatičko-medularna (SAM) os, koja regulira prvi odgovor na stres i os hipotalamus-adenohipofiza-kora nadbubrežne žlijezde (HPAC), čija se aktivacija uočava 15 do 20 minuta nakon stresnog podražaja. HPAC os ima glavnu ulogu u povezivanju stresa i njegovog djelovanja na ciljne fiziološke sustave u organizmu.

Cilj ovog istraživanja bilo je ispitati bazalnu, fiziološku aktivnost SAM i HPAC osi te njihovu povezanost s nizom kovarijabli (spol, tip škole, turnus pohađanja nastave, ritam spavanja i budnosti te demografska, akademska i društvena obilježja) u zdravih učenika koji pohađaju završne razrede srednjih škola. Specifični ciljevi uključivali su ispitivanje koncentracije kortizola i aktivnosti alfa-amilaze kao salivarnih biljega stresa te istraživanje njihove povezanosti sa subjektivnim procjenama razine stresa i sa strategijama suočavanja sa stresom, kao i s polimorfizmima jednog nukleotida (SNP) gena za mineralokortikoidni i glukokortikoidni receptor (rs5522, rs6189, rs6190) te za vezni protein 5 za FK506 (rs1360780).

U istraživanje su bila uključena 903 maturanta gimnazija i strukovnih škola iz četiri najveća grada u Hrvatskoj (Zagreb, Split, Rijeka i Osijek). Uzorci sline prikupljeni kod kuće, tijekom jednog radnog dana u tri vremenske točke (po buđenju, 30 do 45 minuta nakon buđenja i neposredno prije lijezanja), uzeti su za analizu koncentracija kortizola dok se aktivnost alfa-amilaze mjerila samo u jednom uzorku, neposredno po buđenju. Kako bi se ispitaio cirkadijalni ritam lučenja kortizola analizirani su i indeksi lučenja kortizola (CAR, DCD, AUC<sub>G</sub>).

Učenice su imale statistički značajno veće koncentracije kortizola u jutarnjim satima, dok se koncentracije kortizola neposredno prije lijezanja nisu razlikovale među spolovima. Učenice imaju različite obrasce priprema za izazove koji ih očekuju tijekom nadolazećeg dana u odnosu na učenike, imaju značajno viši CAR, izraženiji DCD, veći AUC<sub>G</sub> u odnosu na učenike koji su imali statistički značajno veću aktivnost alfa-amilaze. Turnus pohađanja nastave, koji svakako posljedično utječe na ritam spavanja i trajanje budnosti, pokazao se kao prediktor lučenja kortizola. Statistički značajne razlike većine varijabli kortizola potvrđene su između učenika koji pohađaju različite turnuse nastave (SCC<sub>30-45</sub>, CAR, DCD i AUC<sub>G</sub>). Učenici koji su se budili ranije i imali duže trajanje budnosti imali su veći CAR, niži DCD i veći AUC<sub>G</sub>. Nisu potvrđene statistički značajne razlike niti jedne ispitivane varijable u

učenika koji pohađaju različite tipove škola (gimnazije vs. strukovne škole). Također, statistički značajne razlike između učenika i učenica bile su uočene i u subjektivnoj procjeni stresa, suočavanju te njihovoj povezanosti s koncentracijama i indeksima kortizola. Zabrinutost za budućnost su oba spola procijenila kao najstresniju domenu života, dok su učenice imale statistički značajno veću razinu ukupnog stresa u odnosu na učenike te su više koristile aktivno suočavanje sa stresom. U ovom su istraživanju pronađene statistički značajne razlike povezanosti alela G polimorfizma rs 5522 s višom koncentracijom kortizola po buđenju ( $P=0,036$ ), nižim CAR-om ( $P=0,021$ ), dok je povezanost s DCD-om bila granična ( $P=0,050$ ). Može se pretpostaviti kako učenici s dokazanim alelom G imaju niži CAR te zbog toga pokazuju lošiju pripremljenost za stresne izazove u nadolazećem danu, unatoč nešto izraženijim vrijednostima DCD-a.

Ovo istraživanje ukazuje na potrebu definiranja protokola prikupljanja uzoraka slina u nekliničkim uvjetima i metodoloških smjernica za populacijska istraživanja, ponajprije zbog postojanja niza kovarijabli koje utječu na mjerenje koncentracije kortizola i aktivnosti alfa-amilaze. Dobiveni rezultati doprinose saznanjima o spolnim razlikama u funkciji HPAC osi, koje bi se trebale primijeniti i tijekom provedbe preventivnih mjera u adolescenata te ranijeg otkrivanja skupina koje su posebno osjetljive na stresne poticaje.

**Ključne riječi:** salivarni kortizol, salivarna alfa-amilaza, psihosocijalni stresni poticaji, rs5522, rs6189, rs6190, rs1360780

## SUMMARY

Physiological response to stress and the control of the stress response is mediated by two major components of the neuroendocrinological systems, sympathetic nervous (SAM) system and hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. In the stress response, the SAM axis is first activated. About fifteen to twenty minutes following the SAM activation, the HPA axis is activated. The role of the HPA axis is to affect target physiological systems during the stress response.

The aim of the study was to examine basal, physiologically activity of the SAM and HPAC axis activity and to determine associations of various covariates (gender, school type, school shift, sleep-wake rhythm, demographic, academic and life style characteristics) with altered daily salivary cortisol profiles in healthy students attending finishing grades of secondary schools. Specific aims of the study were to analyse concentration of cortisol and activity of alpha- amylase, as salivary markers of stress reaction, to determine association of salivary markers of stress with stress perception and coping, and to determine associations of salivary markers of stress with single nucleotide polymorphisms (SNP) in the genes for the mineralocorticoid and glucocorticoid receptors (rs5522, rs6189, rs6190) and FK506 binding protein 5 (rs1360780).

The study included 903 secondary school students enrolled in the finishing classes of gymnasiums and vocational schools from the four largest cities in Croatia (Zagreb, Split, Rijeka and Osijek). The saliva samples were collected at students' homes, over the course of one weekday. Salivary cortisol was sampled at three time points: at awakening, 30 to 45 after wakening and at bedtime. Salivary alpha-amylase was sampled at awakening. In order to analyse the circadian rhythm of salivary cortisol secretion, three indexes were analysed (CAR, DCD and AUC<sub>G</sub>).

Females had higher morning concentrations of salivary cortisol than males, whereas bedtime cortisol concentrations were not different in females and males. Females had different salivary cortisol profile and different mechanisms for preparing for the anticipated stress of the upcoming day, higher CAR, steeper DCD and larger AUC<sub>G</sub> than males. On the other side, males had higher activity of salivary alpha-amylase.

School shift, and therefore the sleep-wake up rhythm, was an important predictor of the secretion of salivary cortisol. There were statistically significant differences in two school



shifts with respect to the majority of salivary cortisol measures ( $SCC_{30-45}$ , CAR, DCD and  $AUC_G$ ). Students who woke-up earlier and were longer awake had larger CAR, flatter DCD and larger  $AUC_G$ . Students from two types of schools (gymnasiums vs. vocational schools) did not differ in any of the measured salivary variables.

Furthermore, female and male students differed significantly in stress perception, coping and associations between stress perception, coping and salivary cortisol concentrations and indexes. Future was rated as the most stressful problem domain in both sexes. The perception of total stress was higher in females than males, and females used more active coping than males. Finally, we found statistically significant differences in associations between G allele of rs 5522 polymorphism and higher cortisol concentration at awakening ( $P=0.036$ ), lower CAR ( $P=0.021$ ) and higher DCD ( $P=0.050$ ), but at borderline. It can be hypothesized that the G allele is associated with the lower CAR and therefore, decreased ability of preparing for the anticipated stress (despite borderline association with the steeper DCD).

This study points to the need for defining the protocol for salivary sampling in non-clinical conditions and developing methodological guidelines for population-based research, primarily due to the number of co-variables that affect the concentration of salivary cortisol and the activity of salivary alpha-amylase. Obtained results contribute to better understanding of sex differences in the functioning of the HPA axis, which should be considered in the prevention of various psychopathological conditions in adolescence and used for earlier identification of vulnerable groups at high risk of stress-related health problems.

**Key words:** salivary cortisol, salivary alpha-amylase, psychosocial stressors, rs5522, rs6189, rs6190, rs1360780

## POPIS KRATICA

ACTH - adenokortikotropni hormon

ADH - antidiuretski hormon

ADHD - hiperaktivni poremećaj (engl. attention deficit hyperactivity disorder)

AUC<sub>G</sub> - površina ispod krivulje dnevnog izlučivanja kortizola (engl. area under the curve)

AŽS - autonomni živčani sustav

BIC - Bayesov informacijski kriterij

BMI - indeks tjelesne mase (engl. body mass index)

CAR - odgovor kortizola na buđenje (engl. cortisol awakening response)

CASQ - upitnik suočavanja sa stresom (eng. Coping Across Situations Questionnaire)

CBG - globulin koji veže kortikosteroide (engl. corticosteroid binding globulin)

CLSI - Institut za kliničke i laboratorijske standarde (eng. Clinical and Laboratory Standards Institute)

CNS - središnji živčani sustav (engl. central nervous system)

CRH - hormon koji oslobađa kortikotropin (engl. corticotropin-releasing hormone)

DCD - cirkadijalno smanjenje kortizola (engl. diurnal cortisol decline)

DCS - cirkadijalno smanjenje kortizola (engl. diurnal cortisol slope)

DHEA - dehidroepiandrosteron sulfat

DELFI - imunokemijska metoda na tvrdom nosaču, povezana s lantanidom (engl. dissociation enhancement lanthanide fluoroimmunoassay)

ELISA - imunokemijska metoda na tvrdom nosaču, povezana s enzimom (engl. enzyme-linked immunosorbent assay)

ESC - Europsko društvo za kardiologiju (engl. the European Society of Cardiology)

ESH - Europsko društvo za hipertenziju (engl. the European Society of Hypertension)

FKBP5 - vezni protein 5 za FK506

FSH - hormon koji stimulira folikule (engl. follicle-stimulating hormone)

GAS - opći adaptacijski sindrom (engl. general adaptation syndrome)

GH - hormon rasta (engl. growth hormone)

GR - glukokortikoidni receptor

GRE - element u DNA slijedu koji odgovara na glukokortikoid (engl. glucocorticoid response element)

HPAC os - os hipotalamus-adenohipofiza-kora nadbubrežne žlijezde (engl. hypothalamic-pituitary-adrenocortical)

HPG os - os hipotalamus-adenohipofiza-gonade

Hsp90 - protein toplinskog šoka 90

HWE - Hardy-Weinberg ravnoteža

LH - luteinizirajući hormon (engl. luteinizing hormone)

MAF - učestalost rjeđeg alela (engl. minor allele frequency)

MR - mineralokortikoidni receptor

NHANES - Nacionalno istraživanje zdravlja i prehrane Sjedinjenih Američkih Država (engl. the National Health and Nutrition Examination Survey)

OC - oralna kontracepcija

POMC - pro-opiomelanokortin (engl. pro-opiomelanocortin)

PTSP - posttraumatski stresni poremećaj

PVN - paraventrikularna jezgra (engl. paraventricular nucleus)

PQ - problemski upitnik stresa (engl. Problem Questionnaire)

RT-PCR - lančana reakcija polimerazom s reverznom transkripcijom (engl. reverse transcription polymerase chain reaction)

sAA - salivarna alfa-amilaza

SAM os - os simpatikus-medula

SCC<sub>0</sub> - koncentracija kortizola po buđenju (engl. cortisol concentration at awakening)

SCC<sub>30-45</sub> - koncentracija kortizola 30 do 45 minuta nakon buđenja

SCC<sub>večer</sub> - koncentracija kortizola neposredno prije lijeganja (engl. cortisol concentration at bedtime)

SCN - suprahijazmatska jezgra (engl. suprachiasmatic nucleus)

SNP - polimorfizam jednog nukleotida (engl. single nucleotide polymorphism)

TSH - hormon koji stimulira štitnu žlijezdu (engl. thyroid-stimulating hormone)

TSST - engl. Trier Social Stress Task

WHR - omjer opsega struka i bokova (engl. waist-to-hip ratio)

WHtR - omjer opsega struka i visine (engl. waist-height ratio)

# SADRŽAJ

<b>1</b>	<b>UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1	Stres .....	1
1.1.1	Pojam i definicije stresa.....	1
1.1.2	Razvoj suvremenih teorija stresa.....	2
1.1.3	Suvremene teorije stresa.....	3
1.1.3.1	Stres kao interakcija između pojedinca i okoline - kognitivni model .....	4
1.1.3.2	Stres kao podražaj - podražajni model .....	5
1.1.3.3	Stres kao fiziološki odgovor organizma - biološki ili reakcijski model .....	6
1.1.3.3.1	Neuronska os: fiziološki stresni odgovor izravnom inervacijom ciljnih organa ...	7
1.1.3.3.2	Neuroendokrina os: fiziološki stresni odgovor reakcijom „borba ili bijeg“ .....	8
1.1.3.3.3	Endokrina os: fiziološki stresni odgovor uvjetovan hormonskom reakcijom .....	10
1.2	Kortizol i HPAC os.....	10
1.2.1	Cirkadijalni ritam lučenja kortizola.....	13
1.2.2	Kontrola izlučivanja kortizola i fiziološka regulacija cirkadijalnog ritma .....	15
1.2.3	Indeksi cirkadijalnog ritma lučenja kortizola .....	17
1.2.3.1	Koncentracija kortizola po buđenju.....	18
1.2.3.2	Odgovor kortizola na buđenje .....	18
1.2.3.3	Cirkadijalno smanjenje kortizola.....	19
1.2.3.4	Površina ispod krivulje .....	20
1.2.3.5	Koncentracija kortizola neposredno prije ližeganja .....	20
1.2.4	Kovarijable lučenja kortizola .....	21
1.2.5	Vrste uzoraka za laboratorijske analize kortizola.....	22
1.3	Amilaza.....	24
1.4	Genski biljezi stresnog odgovora .....	27
1.4.1	Glukokortikoidni receptor (GR) .....	27
1.4.2	Mineralokortikoidni receptor (MR).....	30
1.4.3	FK506-vezujući protein 5 (FKBP5) .....	33
<b>2</b>	<b>OBRAZLOŽENJE TEME .....</b>	<b>36</b>
<b>3</b>	<b>MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>39</b>
3.1	Ispitanici .....	39
3.1.1	Demografska, akademska, društvena i zdravstvena obilježja učenika .....	43
3.2	Uzorkovanje sline / prikupljanje uzoraka sline .....	44
3.3	Analize koncentracija kortizola i aktivnosti alfa-amilaze.....	45
3.4	Izolacija DNA iz uzorka sline .....	47
3.5	Analize genskih polimorfizama .....	48
3.6	Statističke analize .....	49

<b>4</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>50</b>
4.1	Ispitanici.....	50
4.1.1	Demografska, akademska, društvena i zdravstvena obilježja učenika .....	50
4.2	Laboratorijske analize salivarnih biljega.....	54
4.2.1	Koncentracije salivarnog kortizola i aktivnost alfa-amilaze .....	54
4.2.2	Razdioba koncentracija salivarnog kortizola, indeksa cirkadijalnog ritma lučenja i aktivnosti alfa-amilaze u poduzorku razvrstanom prema spolu .....	60
4.2.3	Korelacijske analize koncentracija salivarnog kortizola, indeksa cirkadijalnog ritma lučenja i aktivnosti alfa-amilaze u ukupnom uzorku.....	69
4.3	Klusterske analize.....	70
4.3.1	Koncentracije salivarnog kortizola, indeksi cirkadijalnog ritma lučenja i aktivnosti alfa-amilaze na poduzorku klastera .....	71
4.3.2	Indeks odgovora kortizola na buđenje (CAR) u cjelokupnom uzorku, poduzorcima razvrstanim prema spolu, turnusu i klasteru.....	74
4.4	Referentni intervali koncentracija salivarnog kortizola, indeksa cirkadijalnog ritma lučenja i aktivnosti alfa-amilaze poduzoraka podijeljenog prema spolu .....	76
4.5	Procjena stresa i suočavanja.....	78
4.5.1	Analiza stresa po domenama života u cjelokupnom uzorku i poduzorcima razvrstanim prema spolu .....	78
4.5.2	Korelacijske analize stresa po domenama života i koncentracija salivarnog kortizola, indeksa cirkadijalnog ritma lučenja i aktivnosti alfa-amilaze u poduzorcima razvrstanim prema spolu.....	80
4.5.3	Analiza načina suočavanja sa stresom u cjelokupnom uzorku i poduzorcima razvrstanim prema spolu .....	83
4.5.4	Korelacijske analize različitih načina suočavanja sa stresom s koncentracijama salivarnog kortizola, indeksa cirkadijalnog ritma lučenja i aktivnosti alfa-amilaze u uzorku učenika i učenica .....	85
4.6	Analize genskih polimorfizama .....	87
4.6.1	Učestalost alela gena za mineralokortikoidni (MR), glukokortikoidni receptor (GR) te vezni protein 5 za FK506 u cjelokupnom uzorku i poduzorcima razvrstanim prema spolu .....	87
4.6.2	Učestalost genotipova i testiranje pokoravanja Hardy-Weinbergovom zakonu ravnoteže u genima za mineralokortikoidni (MR), glukokortikoidni receptor (GR) te vezni protein 5 za FK506 u cjelokupnom uzorku i poduzorcima razvrstanim prema spolu.....	88
4.6.3	Analize varijance pojedinačnih SNP lokusa i fenotipskih varijabli lučenja salivarnog kortizola u cjelokupnom uzorku i poduzorcima razvrstanim prema spolu.....	91
4.6.4	Analize povezanosti pojedinačnih SNP lokusa i fenotipskih varijabli lučenja salivarnog kortizola.....	96
<b>5</b>	<b>RASPRAVA.....</b>	<b>99</b>
<b>6</b>	<b>ZAKLJUČCI.....</b>	<b>115</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>117</b>
<b>8</b>	<b>ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>124</b>



# 1 UVOD

## 1.1 Stres

### 1.1.1 Pojam i definicije stresa

Stres nije fenomenološka karakteristika novog doba, već je poveznica između čovjeka i stresa povijesno neprekidna i neophodna za održavanje ljudske vrste. Stoga je stres kao temu zanimljivo istraživati s više aspekata, od antropoloških, psiholoških do molekularno-biokemijskih. Čovjek se, dakle, kroz različite faze evolucijskog razvoja kontinuirano suočavao sa zahtjevima koji su bili stresni jednako kao što su za suvremena čovjeka stresne današnje životne okolnosti. Da stres nije privilegija današnjeg vremena dokazuje i činjenica opisivanja simptoma posttraumatskog stresa u antičkim zapisima. Također, u ranim razdobljima evolucijskog razvoja stres je doprinio savladavanju izazova koji su omogućili preživljavanje. Stoga se stres ne može promatrati samo kroz prizmu negativnog utjecaja po zdravlje čovjeka već i u smislu pozitivne, motivirajuće, produktivne sile koja poboljšava kvalitetu života. Danas, međutim, stresno uzbuđenje koje postaje pretjerano intenzivno ili pak kronično uzrokuje disfunkciju i/ili bolest ciljnih organa. Rezultat stresnog uzbuđenja je biokemijska i/ili strukturna promjena u ciljnom organu, a očituje se kao psihofiziološka bolest ili psihosomatska bolest.

Zbog toga se istraživanju stresa u zadnje vrijeme posvećuje sve više pažnje u okviru interdisciplinarnih istraživanja, posebice onima u djece i adolescenata, čiji se broj u posljednje tri godine udvostručio u odnosu na prethodno razdoblje<sup>1</sup>. Istraživanja stresa u adolescenata u žarištu su pozornosti stoga što se adolescente drži posebno osjetljivom skupinom izloženom različitim izvorima stresa. Ulazak u adolescenciju vezan je uz veću prisutnost negativnih emocija i stoga uz porast kognitivnih poteškoća određenog broja adolescenata<sup>2</sup>. Uspješan prijelaz iz adolescencije u odraslu dob univerzalno je zahtjevan proces<sup>3</sup>. Adolescenti se suočavaju s važnim životnim odlukama koje će imati utjecaja na njihovu budućnost, posebice onih povezanih s izborom profesije na fakultetu ili pronalaskom radnog mjesta na nesigurnom tržištu rada. Provedena istraživanja pokazala su da se tipični adolescent brine zbog nekoliko velikih tema kao što su nezadovoljavajući uspjeh u školi, raskid emotivnih veza, ali i zbog budućnosti, odnosno buduće nesigurnosti vezane uz akademski uspjeh i zapošljavanje nakon završetka školovanja<sup>4</sup> te mogućih ekoloških katastrofa<sup>5</sup>.



Uspješna tranzicija iz adolescencije do odrasle dobi zahtjeva kompetencije u različitim razvojnim životnim etapama (npr. izgradnja čvršćih emotivnih veza, postavljenje i ostvarivanje životnih ciljeva vezanih uz obrazovanje, profesionalnu karijeru, zasnivanje obitelji), od kojih svaka za sebe može predstavljati izvor stresa<sup>6,7</sup>. Larson (2002.) te Blossfeld i Hofmeister (2005.) su pokazali da različite kulturne promjene kao što su globalizacija, informatizacija, razvoj tehnologija, promjene u obiteljskoj strukturi i ekonomska neravnopravnost izlažu mlade visokom stupnju nesigurnosti.

Bauer, Quas i Boyce (2002.) istraživali su različite fiziološke sustave čija aktivnost određuje ponašanje, zdravlje i razvoj adolescenata. Dokazali su da zajedničko, interaktivno djelovanje i HPAC osi i autonomnog živčanog sustava (AŽS) ima značajan utjecaj kako na razvoj adolescenata tako i na pojavnost različitih patoloških stanja i bolesti. Zaključili su da bi istraživanja samo jednog fiziološkog sustava i njegove poveznice sa stresom u populaciji adolescenata rezultirala nedostatnim odgovorima o međudjelovanjima niza fizioloških sustava, a posebice HPAC osi i AŽS-a.

### **1.1.2 Razvoj suvremenih teorija stresa**

Tijekom povijesti, o pojavama koje bi se mogle označiti pojmom stresa raspravljalo se u područjima medicine i fiziologije još u 19. stoljeću. Francuski fiziolog Claud Bernard (1813.-1878.) opisuje važne elemente fiziologije stresa, te naglašava potrebu očuvanja konstantnosti i stabilnosti unutrašnje sredine organizma (franc. *milieu intérieur*). Američki fiziolog Walter B. Cannon (1871.-1945.), uvodi pojam „homeostaza“, kojeg opisuje kao fiziološke procese koji održavaju postojanim stanje organizma. Prvi je dokazao ulogu hormona nadbubrežne žlijezde pri adaptacijskom odgovoru organizma na prijetnju narušavanja ravnoteže. Brojnim fiziološkim pokusima Cannon je potvrdio postojanje specifičnih fizioloških procesa koji pripremaju organizam za borbu ili bijeg<sup>8</sup>. Smatrao je da će brza aktivacija homeostatskog sustava, odnosno nadbubrežne žlijezde i simpatičkog živčanog sustava za koje je mislio da djeluju kao jedinstvena cjelina očuvati cjelovitost organizma prilagođavanjem i na taj način omogućiti veću šansu za preživljavanje. Cannon je, jednako kao i Selye, smatrao da organizam bez obzira na vrstu prijetnje reagira na isti nespecifičan način te da se nadbubrežna žlijezda i simpatički živčani sustav aktiviraju isključivo u stresu<sup>9</sup>.

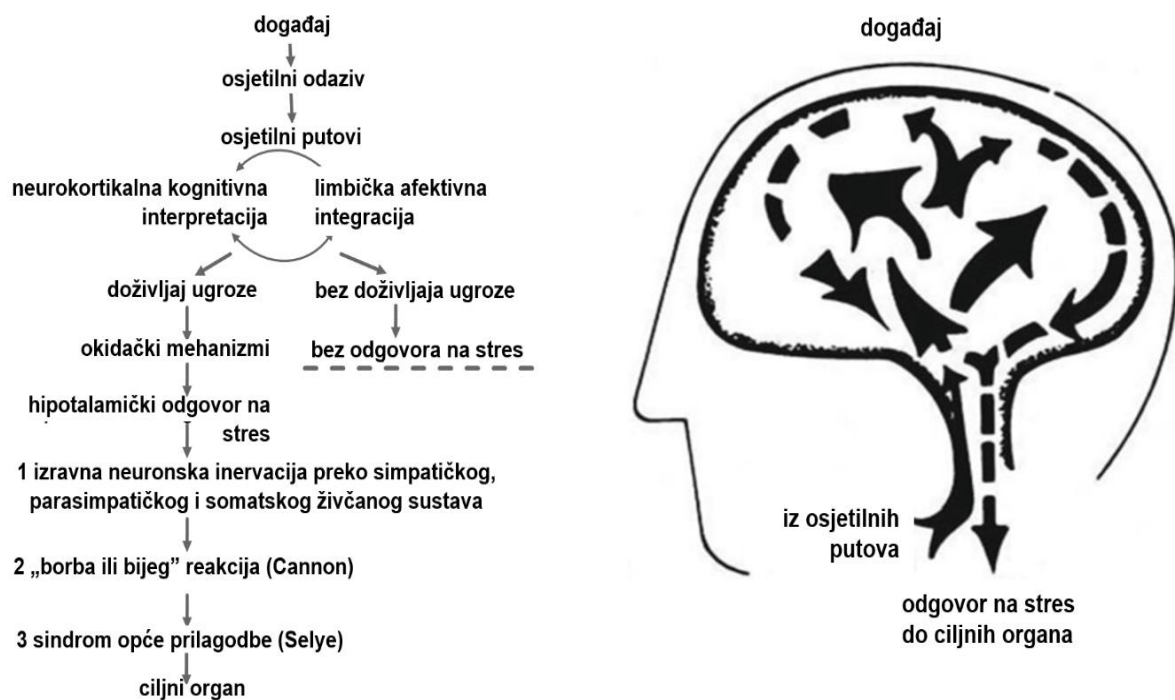
Hans Selye (1907.-1982.), kanadski endokrinolog mađarskog podrijetla, već kao student medicine u Pragu 1926. godine uvodi pojam stres. Opisuje bolesnike sa sličnim simptomima poput gubitka apetita, smanjene mišićne snage, povećanog krvnog tlaka i gubitka ambicije.

Na temelju ovih opažanja Selye predlaže koncept općeg adaptacijskog sindroma (engl. *General Adaptation Syndrome*, GAS) pri čemu organizam nakon štetnog podražaja (primjena različitih toksičnih tvari, hladnoća, fizički napor, kirurške ozljede itd.) prolazi kroz tri adaptacijske faze: a) kratka početna alarmna reakcija, b) stadij otpora i c) stadij iscrpljenja. Pojam stresa istraživao je i dalje tijekom prve polovice 20. stoljeća kao „*the syndrome of just being sick*“ (Selye, 1956. g.). Prema njegovoj teoriji stres je opisan kao ukupnost svih nespecifičnih promjena odnosno odgovora unutar organizma na bilo koji zahtjev (Selye, 1974. g.). Iako Selye govori o stresu kao nespecifičnom odgovoru, potencijalne interindividualne razlike u odgovoru na stresni podražaj naslućuju se u njegovom razlikovanju pojmova distress koji označava negativni, neugodni, štetni oblik stresa i eustres koji označava pozitivni oblik tj. uspješnu adaptaciju na promjenu<sup>10</sup>.

Godine 1939. časopis *Journal of Psychosomatic Medicine* prvi put objavljuje rezultate istraživanja o povezanosti psiholoških i fizioloških procesa i na taj način u medicinu uvodi pojam „medicine stresa“ ili „psihosomatske medicine“. Kasnih 60-ih i ranih 70-ih godina prošlog stoljeća povećava se interes za istraživanje psihofiziološke prirode stresnog odgovora. Istraživanja je omogućio razvoj novih analitičkih metoda kojima se mjere koncentracije hormona. Današnja saznanja ne potvrđuju ranu teoriju stresa kao nespecifičnog odgovora, već ukazuju na visoko specifičan psihofiziološki odgovor organizma na različite stresne poticaje te na individualno visoku specifičnost odgovora na stresor.

### **1.1.3 Suvremene teorije stresa**

Novije teorije stres opisuju kao fiziološki mehanizam koji posreduje između podražaja (stresora) i aktivacije ciljnog organa. Fiziološka reakcija koja pri tome nastaje specifična je zato što ovisi o vrsti samog stresora i kognitivnoj interpretaciji te o sposobnosti pojedinca da se nosi s nastalom situacijom (slika 1.1).



**Slika 1.1** Stresni odgovor (preuzeto i prilagođeno prema: „A clinical guide to the treatment of the human stress response, treće izdanje 2013. autori Everly GS Jr, Lating JM)

Pojam stresa je složen te zbog toga postoje brojni pristupi istraživanju i definicije istog ovisno o teorijskom pristupu autora, odnosno o aspektu stresa koji se istražuje.

### 1.1.3.1 Stres kao interakcija između pojedinca i okoline - kognitivni model

Stres se definira kao odnos osobe i okoline u kojem osoba procjenjuje situaciju kao prezahtjevnu u usporedbi sa svojim resursima ili prijeteću za vlastitu dobit. Također, stres je psihosocijalni, fiziološki odgovor na stresni poticaj kojeg možemo promatrati i kao mehanizam koji povezuje bilo koji stresni poticaj i ciljni organ ili uzbuđenje.

Činjenica je da stresori ne izazivaju izravne reakcije, već da pojedinac kognitivno procjenjuje zahtjeve koji se pred njega postavljaju, a nakon toga usljeđuju ponašajne i fiziološke reakcije. Jedan od vodećih istraživača interakcijskog poimanja stresa je Richard S. Lazarus (1922.-2002.). On već 1966. godine psihološki stres predstavlja kao interakciju između osobe i okoline<sup>11</sup>. Kasnijim radovima, zajedno sa Susan Folkman pozornost posvećuje ulozi kognitivnih procjena stresnog događaja te načinima suočavanja sa stresom. Lazarus definira

stres kao negativnu afektivnu reakciju zasnovanu na kognitivnoj procjeni situacije kao opasne ili prijeteće<sup>12</sup>. Psihološki stres nastaje kad osoba procijeni da neće moći udovoljiti okolišnim i/ili unutarnjim zahtjevima jer ti zahtjevi nadilaze njezine mogućnosti. Pri tome su važna dva mehanizma: procjena i način suočavanja. Procjena se bazira na pridavanju značenja određenoj situaciji koje Lazarus dijeli na tri kategorije: prijetnju, štetu i izazov<sup>13</sup>. Stresan podražaj je onaj koji je već nanio neku štetu, zatim prijetnja (podražaj potencijalno može biti štetan ili dovesti do nekog gubitka) i izazov (potencijalni dobitak uz moguće teškoće). Evaluacija različitih opcija suočavanja u obzir uzima i prirodu izvora opasnosti i dostupnost pojedinih resursa, ali i osobne čimbenike.

U modernoj terminologiji proces prilagodbe na akutne stresne promjene naziva se alostaza. Održavanje stabilnosti ili homeostaza kroz promjene kao pojam alostaze uvode znanstvenici Peter Sterlin i Joseph Eyer<sup>14</sup>. Opisujući fiziologiju alostatskih, adaptivnih mehanizma u organizmu ova dva istraživača objašnjavaju i mehanizme aktivnog suočavanja sa stresnim podražajima. Nemogućnost prilagodbe rezultira alostatskim opterećenjem tj. opterećenjem tijela i mozga koje potiče od kronične prekomjerne aktivnosti ili neaktivnosti fizioloških mehanizama koji su uključeni u prilagodbu na promjene u okolišu<sup>15</sup>. Termin alostatsko opterećenje prvi put spominje Bruce S. McEwen<sup>16</sup>. Budući je definirani kognitivni model stresa isključivo psihološki model razvijaju se i naredne dvije definicije.

### **1.1.3.2 Stres kao podražaj - podražajni model**

Podražaj koji izaziva stresni odgovor nazivamo stresorom. Uvodeći pojam stresa, Selye ga je posudio iz fizike i tako pridonio početnim nesuglasticama o odnosu podražaja i stresa. Stresni podražaji mogu biti različite prirode - od psihosocijalnih do biogenih stresora. U skupinu psihosocijalnih stresora spada većina stresora s kojima se svakodnevno susrećemo. Oni zahtijevaju kognitivnu interpretaciju koja omogućuje procjenu utjecaja podražaja na naš organizam (po teoriji Lazarusa i Folkmana). U svakodnevnom životu to znači da fiziološku reakciju ne izaziva stresor već naša procjena istog<sup>17</sup>.

Psihosocijalni stresori mogu biti kratki akutni stresori izazvani u laboratorijskim uvjetima (javni nastup, rješavanje matematičkih problema), kratki stresori u svakodnevnom životu (npr. polaganje ispita, stres na poslu, svakodnevni stresori iz okoline), stresni životni događaji (npr. gubitak bliske osobe dovodi do produljene stresne reakcije koja s vremenom najčešće jenjava), kronični stresori koji u potpunosti prožimaju život pojedinca bez naznake da bi se stresna reakcija mogla stišati (invaliditet, briga za bolesnog člana obitelji), stresori iz prošlosti

(intenzivna trauma s dugoročnim posljedicama poput npr. zlostavljanja u djetinjstvu, sudjelovanja u ratu, zarobljeništvu)<sup>18</sup>. U navedene stresore treba uključiti i sociodemografske faktore, kao što su socioekonomski status (koji bi po trajanju pripadao kroničnim stresorima) kao i moderatore stresne reakcije, kao što su psihološke osobine pojedinca (depresivnost, anksioznost, agresivnost). Posebno je značajno naglasiti razliku između akutnih i kroničnih stresora zato što je adaptacijska reakcija na kratkotrajne stresore ograničena, dok produljena ili opetovana reakcija na kronični stresor iscrpljuje rezerve organizma i može djelovati štetno<sup>19</sup>.

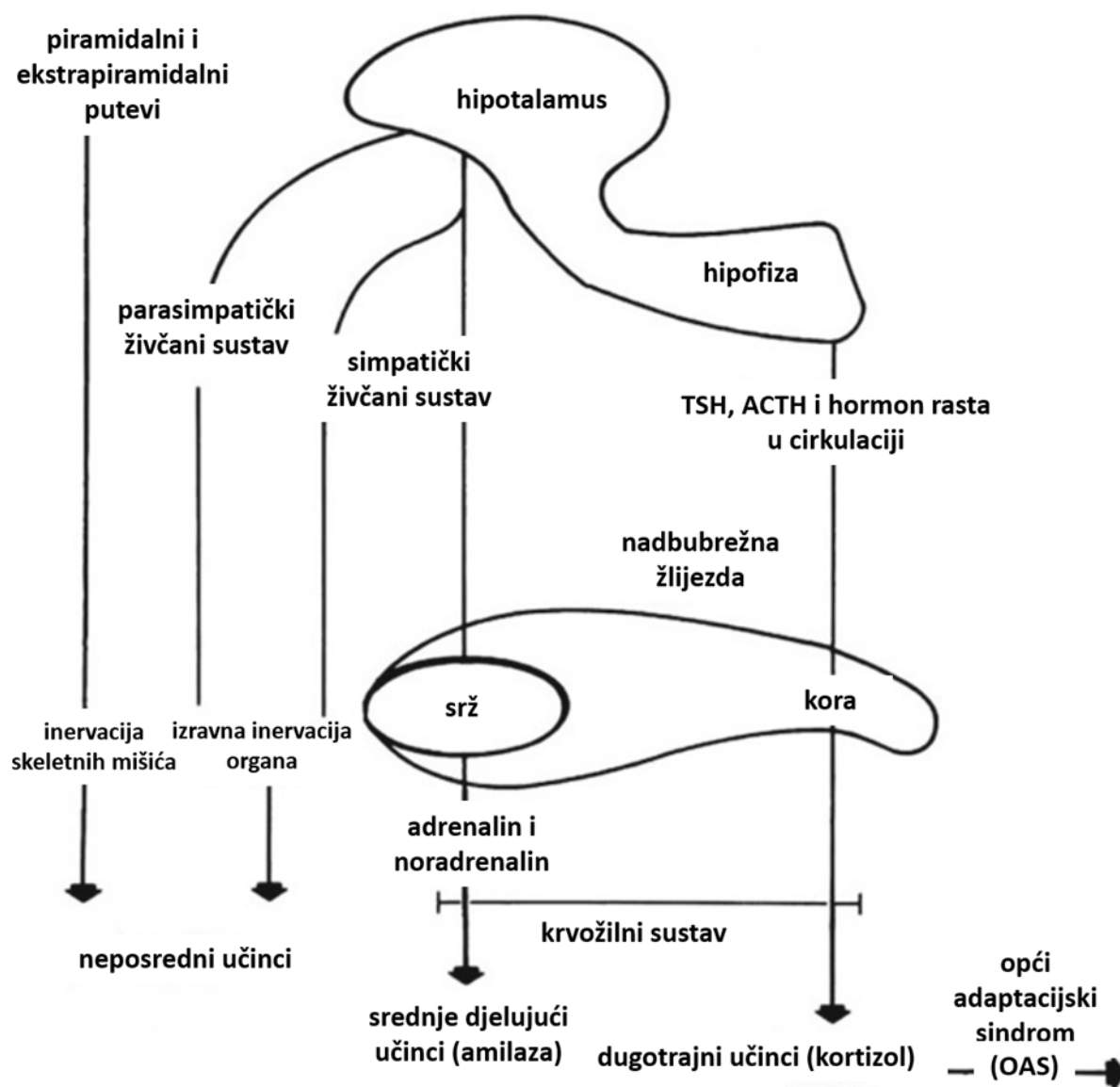
Za razliku od psihosocijalnih stresora, biogeni stresori za izazivanje fiziološkog odgovora ne trebaju kognitivnu procjenu. Biogeni stresori su specifični kemijski spojevi iz kave, čaja, ginsenga, guarana, ginko bilobe i sredstva zlouporabe (kao amfetamini i kokain), ali i nespecifični stresori poput ozljeda, infekcija, boli, kardiovaskularnih stresora. Ekstremna vrućina, hladnoća i vježbanje također izazivaju fiziološku reakciju bez potrebne kognitivne procjene te ih stoga možemo smatrati biogenim stresorima. Prva istraživanja stresa koja je provodio Hans Selye bavila su se prvenstveno biogenim stresorima pa otuda i prva definicija o stresu kao nespecifičnom odgovoru. Istraživanja koja bi obuhvaćala samo stresore nedostatna su te su se posljednjih dvadesetak godina istraživanja usmjerila na povezanost između stresora i poremećaja tzv. distres.

### **1.1.3.3 Stres kao fiziološki odgovor organizma - biološki ili reakcijski model**

Biološki model stresnog odgovora daje odgovor na pitanje koji su to dinamički procesi koje se opisuje kao mehanizam koji posreduje između stresnog poticaja i ciljnog organa te koji su to organski sustavi i fiziološki procesi koji se aktiviraju nakon kognitivne interpretacije. Aktivacija tih fizioloških putova smatra se multidimenzijским, interaktivnim procesom koji se naziva stresni odgovor.

Tijelo reagira na promjene u vanjskom i unutarnjem okolišu na način da sintetizira i luči hormone te neuroprijenosnike koji koordiniraju fiziološke reakcije, a kao odgovor na trenutnu situaciju u kojoj se organizam nalazi. U fiziološki odgovor uključena su dva sustava, endokrini i živčani sustav, koji nisu anatomske, ali zato jesu funkcionalno povezani. Možemo ih smatrati dijelom jedne regulacijske jedinice koja za glavnu funkciju ima komunikaciju među organskim sustavima u tijelu. Dosadašnja istraživanja mehanizama patogeneze bolesti povezanih sa stresom ukazala su na tri fiziološke osi koje se aktiviraju nakon stresnog

podražaja (slika 1.2). Tri su fiziološke osi aktivirane stresom: neuronska os, neuroendokrina os i endokrina os.



**Slika 1.2** Aktivacija tri fiziološke osi stresnim podražajem (preuzeto i prilagođeno prema: „A clinical guide to the treatment of the human stress response“, treće izdanje 2013. autori Everly GS Jr, Lating JM)

#### 1.1.3.3.1 Neuronska os: fiziološki stresni odgovor izravnom inervacijom ciljnih organa

Tri su sustava u okviru živčanog sustava uključena u stresni odgovor: simpatikus, parasimpatikus i somatski živčani sustav. Neuronska aktivacija je prva od svih aktivacija u stresnom odgovoru, a temelji se na izravnoj inervaciji ciljnih organa pa je stoga i najbrža. Djelovanje neuronske aktivacije preko simpatikusa uvijek izaziva opće uzbuđenje unutar

ciljnog organa tzv. ergotropni odgovor, aktivacija parasimpatikusa rezultira inhibicijom tzv. trofotropni odgovor, dok se skeletna muskulatura trenutno aktivira za vrijeme stresa tzv. neuromuskularni odgovor. Takva aktivacija, ukoliko je pretjerana, može voditi do neuromišićne disfunkcije te posljedično do još jačeg emocionalnog uzbuđenja. Stoga je glavno djelovanje ovog sustava u okviru stresnog odgovora trenutno i nije kronično. Razlog je ograničena sposobnost simpatikusa da kontinuirano oslobađa neuroprijenosnike u uvjetima jake kronične stimulacije.

#### **1.1.3.3.2 Neuroendokrina os: fiziološki stresni odgovor reakcijom „borba ili bijeg“**

Visoka razina stresnog uzbuđenja održavana kroz dulje razdoblje temelji se na aktivaciji neuroendokrine osi (simpatičko-medularna os, SAM) ili tzv. osi za *borbu ili bijeg*. Ključnu ulogu u ovom odgovoru ima srž nadbubrežne žlijezde koja se može razmatrati i kao dio autonomnog živčanog sustava, ali i kao endokrina žlijezda.

U tijeku stresne reakcije SAM os aktivira se unutar nekoliko sekundi što rezultira lučenjem katekolamina (većinom adrenalina i u manjoj mjeri noradrenalina) iz srži nadbubrežne žlijezde. U aktivaciju SAM osi uključena je jezgra *locus coeruleus* (sadrži noradrenergičke neurone) u moždanom deblu koja impulse dobiva iz limbičkog sustava, kao i iz hipotalamusa putem kortikotropno oslobađajućeg hormona (engl. *corticotropin-releasing hormone*, CRH)<sup>20</sup>. Do danas je nizom istraživanja dokazana uloga CRH-a kao neurotransmitera tijekom aktivacije *locus coeruleus* i štoviše pokazano je da CRH posreduje aktivaciji *locus coeruleus* te pojačava kognitivni i emotivni odgovor na stresor. Hipotalamus i sustav *locus coeruleus* međusobno su povezani pozitivnom povratnom spregom kroz koju svaki od sustava potiče rad onog drugog<sup>21</sup>. CRH stimulira stvaranje enzima tirozin-hidroksilaze čime potiče sintezu noradrenalina i izravno aktivira SAM os, dok noradrenalin pojačava sintezu CRH u paraventrikularnim jezgrama hipotalamusa. To je dokaz da se tijekom stresne reakcije istovremeno aktiviraju različite osi, uglavnom neuroendokrine i endokrine osi.

Sustav za *borbu ili bijeg* omogućava organizmu da se pripremi za mišićnu aktivnost kao odgovor na prijetnju, a aktivira se nizom različitih psiholoških utjecaja uključujući i psihosocijalne poticaje. Kako bi se izvršila priprema organizma potrebna je pojačana aktivnost svih sustava organizma koji će osigurati obavljanje zahtjevnog mišićnog rada i staviti organizmu na raspolaganje sve izvore raspoložive energije.

Nadbubrežna žlijezda sastoji se od dvije funkcionalno različite jedinice: srži i kore. Srž nadbubrežne žlijezde sastoji se od kromafinskih stanica odgovornih za sintezu i izlučivanje

kateholamina (noradrenalin i adrenalin). Unutar srži nadbubrežne žlijezde aktivne su dvije vrste stanica, A stanice koje izlučuju adrenalin i N stanice koje izlučuju noradrenalin. Smjesa izlučenih kateholamina sastoji se od otprilike 80 % adrenalina i 20 % noradrenalina. Usprkos tome, u cirkulaciji ima više noradrenalina, jer se on osim u srži sintetizira i u neuronima središnjeg živčanog sustava (engl. *central nervous system*, CNS) i u simpatičkim neuronima perifernog živčanog sustava. Biokemijski aktivan noradrenalin u cirkulaciji većinom je podrijetla iz simpatičkih neurona.

Na stimulaciju živčanim sustavom, srž oslobađa smjesu katekolamina koji imaju funkcionalno identično djelovanje kao i izravna simpatička inervacija. Razlika između ove dvije aktivacije je u vremenskom slijedu, pri čemu aktivacija srži ima 20-30 sekundi odgode u reakciji, ali i 10 puta dulji učinak.

Ako govorimo o metaboličkom učinku simpatikusa na jetru i masno tkivo, a jednako tako i adrenalina izlučenog iz srži nadbubrežne žlijezde, njihov učinak se može svesti na kontrolu koncentracije glukoze. Adrenalin inhibira lučenje inzulina i stimulira lučenje glukagona, a ujedno izravno utječe na metabolizam i to stimulacijom glikogenolize i u jetri i u skeletnim mišićima, poticanjem glukoneogeneze i lipolize te inhibicijom korištenja glukoze u skeletnim mišićima. Aktivacija simpatikusa u jetri i masnom tkivu uzrokuje isti metabolički učinak kao i adrenalin.

Aktivacija simpatikusa za vrijeme stresa kao i sinteza adrenalina povezuju se s pripremom organizma na opasnost kod koje će biti potrebna fizička aktivnost ili će doći do ozljede. Prema tome, adaptacijska vrijednost ovog sustava tijekom situacija u kojima se zahtjeva akcija *borbe ili bijega* je neupitna. Ipak, pitanje je koja je svrha ove aktivacije u svakodnevnom životu gdje smo kontinuirano izloženi psihosocijalnim podražajima, te na taj način prolongirana aktivacija može ubrzati razvoj određenih bolesti, posebice onih kardiovaskularnog sustava.

Novija istraživanja usmjerena su na interdisciplinarna razjašnjenja povezanosti bioloških, socioloških i kognitivnih procesa i njihovih interakcija u određivanju rizika u odnosu na otpornost organizma kao odgovora na stres. Stoga, istraživanja koja se provode obuhvaćaju i bihevioralnu i fiziološku stranu stresnog odgovora<sup>22</sup>. Nažalost, do nedavno nisu postojale mogućnosti za takav interdisciplinarni pristup istraživanjima. Naime, za razliku od visoko osjetljivih, točnih i preciznih, te validiranih metoda određivanja koncentracija krajnjeg produkta osi hipotalamus-adenohipofiza-kora nadbubrežne žlijezde (engl. *hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis*, HPAC), kortizola, neinvazivno mjerenje aktivnosti simpatikusa u uzorku sline (katekolamina) nije bilo moguće<sup>23</sup>. Surogatni biljeg čiju aktivnost je moguće



mjeriti u slini, a koji posredno daje uvid u aktivaciju simpatikusa je alfa-amilaza (sAA), najrašireniji enzim u slini kod ljudi.

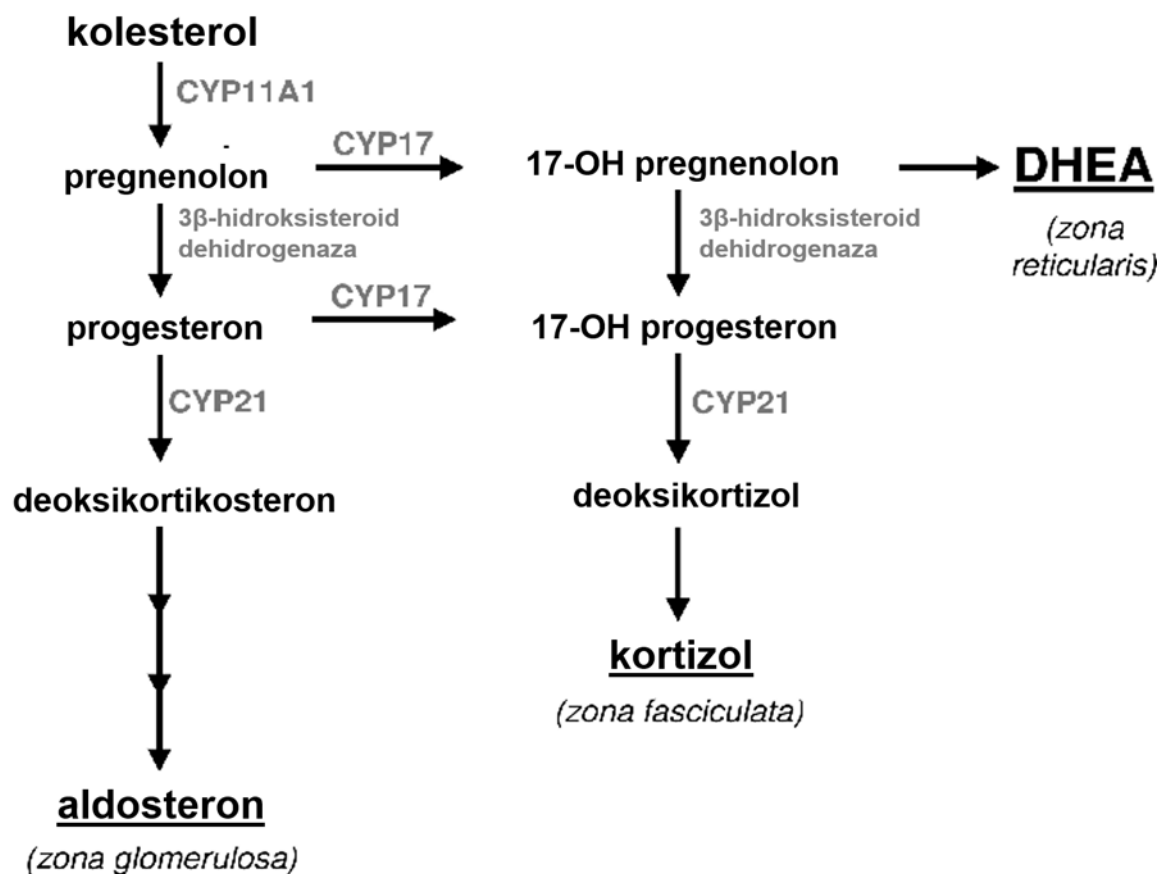
#### **1.1.3.3.3 Endokrina os: fiziološki stresni odgovor uvjetovan hormonskom reakcijom**

Nakon aktivacije neuroendokrine osi (SAM) aktiviraju se i endokrine osi s najdužim odgovorom koji se smatra i kroničnim. Četiri endokrine žlijezde, s hormonima koje izlučuju, sudjeluju u stresnom odgovoru<sup>24</sup>: korteks nadbubrežne žlijezde (kortizol), prednji režanj hipofize (hormon rasta), štitnjača (tiroksin) i stražnji režanj hipofize (oksitocin i vazopresin). Ove četiri endokrine osi sastavni su dio kroničnog stresnog odgovora, a za punu aktivaciju potreban im je najjači stresor.

## **1.2 Kortizol i HPAC os**

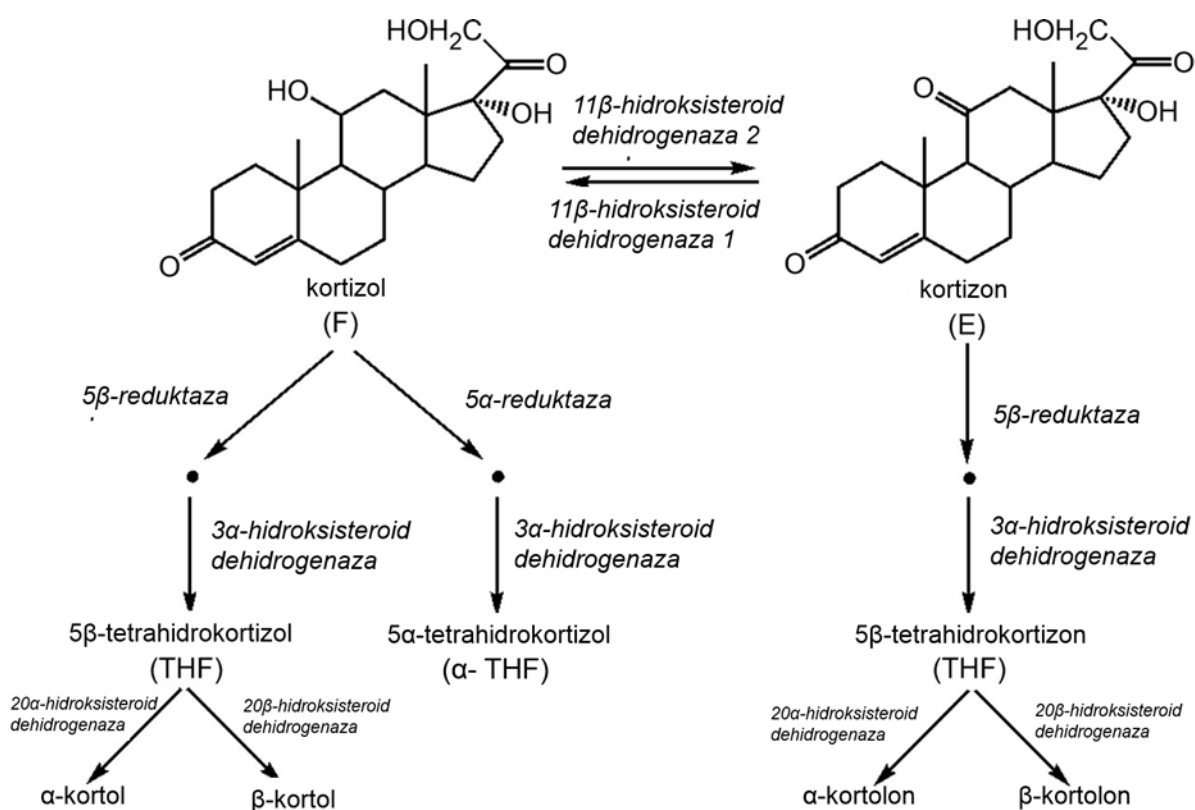
Kortizol je glukokortikoidni, steroidni hormon čiji je prekursor molekula kolesterola. Sintetizira se i izlučuje iz zone fascikulate i retikularis kore nadbubrežnih žlijezda. Kora nadbubrežne žlijezde iz kolesterola sintetizira i luči uz glukokortikoide, i mineralokortikoide te adrenalne androgene (slika 1.3).

Kortizol je u cirkulaciji vezan za globulin koji veže kortikosteroide (engl. *corticosteroid binding globulin*, CBG) te u manjoj mjeri za serumski albumin. Novija istraživanja otkrivaju da funkcija CBG-a nije samo transportna, već je i regulacijska<sup>25,26</sup>. Ukupnu koncentraciju hormona u cirkulaciji čine vezani i slobodni hormoni. Slobodni hormon, kojeg je u slučaju kortizola otprilike 5 -10 %, može pasivnom difuzijom proći kroz staničnu membranu, vezati se na unutarstanične receptore u citoplazmi ili u jezgri i kroz ekspresiju ciljnih gena iskazati svoje djelovanje. Stoga je samo slobodna frakcija hormona fiziološki aktivna.



**Slika 1.3** Shema sinteze glukokortikoida, mineralokortikoida i adrenalnih androgena u kori nadbubrežne žlijezde (DHEA-dehidroepiandrosteron sulfat)

Kortizol se metabolizira i konjugira u jetri u nekoliko inaktivnih oblika. Metabolizam kortizola uključuje enzimsku redukciju dvostruke veze (C-4 i C-5) kojom nastaje tetrahidrokortizol ili tetrahidrokortizon. Konačan produkt metabolizma su kortol i kortolon (slika 1.4). Više od 95 % kortizola i njegovog biološki neaktivnog metabolita kortizona konjugirano je s glukuronskom kiselinom i izlučeno u mokraći kao konjugat.



**Slika 1.4** Shema razgradnje kortizola i metabolita kortizona

Kortizol je hormon neophodan u svakodnevnoj adaptaciji i održavanju homeostaze organizma te predstavlja fiziološki odgovor HPAC osi na akutne i kronične stresore. Također, prediktor je funkcije HPAC osi te općeg zdravlja i smrtnosti<sup>27</sup>.

Fiziološko djelovanje kortizola veže se na važnu, ali blagu ulogu kortizola za vrijeme gladovanja povećavajući koncentraciju glukoze u krvi. Gladovanje je povezano sa stimulacijom i glukoneogeneze i lipolize, procesima koji se aktiviraju i kod fizioloških koncentracija kortizola. Ukoliko osoba ima hipokortizolemiju razviti će manifestnu hipoglikemiju koja će utjecati i na moždane funkcije. Uz stimulaciju glukoneogeneze i lipolize kod bazalnih koncentracija, kortizol koji se u cirkulaciji nalazi u povećanim koncentracijama u stanjima stresa uzrokuje: povećani katabolizam proteina (aminokiseline će se onda u jetri koristiti za glukoneogenezu i pretvorbu u glukozu, ali će se moći ugrađivati kao građevni elementi u sintezi proteina ukoliko treba zacijeliti ozljedu), povećanu glukoneogenezu, smanjeno korištenje glukoze (ne u moždanim stanicama), povećanu razgradnju masti u masnom tkivu (oslobađanje glicerola za glukoneogenezu u jetri, a slobodnih masnih kiselina za oksidaciju i oslobađanje energije), povećavanje vaskularne

reaktivnosti odnosno povećanje sposobnosti glatkog mišićja za vazokonstrikciju kao odgovor na noradrenalin, inhibiciju upale i specifičnih odgovora na patogene i ozljedu (blokira svaku fazu upale: vazodilataciju, povećanu vaskularnu permeabilnost i fagocitozu, blokira lučenje eikozanoida koji su neophodni posrednici alergijskim reakcijama, smanjuje broj cirkulirajućih limfocita, smanjuje i sintezu protutijela i aktivnost citotoksičnih T stanica). Kortizol također djeluje tijekom stresa na način da smanjuje upalne procese štiteći tijelo od mogućeg oštećenja, na endokrini sustav djeluje smanjujući lučenje hormona koji stimulira folikule (engl. *follicle-stimulating hormone*, FSH), luteinizirajućeg hormona (engl. *luteinizing hormone*, LH), hormona koji stimulira štitnu žlijezdu (engl. *thyroid-stimulating hormone*, TSH), hormona rasta (engl. *growth hormone*, GH), na bubrege djeluje zadržavanjem soli i vode, na krvne žile povećavajuću krvni tlak podržavajući vazokonstrikciju, na mozak uzrokujući depresiju i psihozu, na kosti gubitkom koštane mase (inhibicija osteoblasta te promjene u metabolizmu kalcija), na mišiće razgradnjom proteina te posljedično atrofijom mišića te u konačnici redistribucijom masnog tkiva što može rezultirati visceralnom pretilošću. Općenito su djelovanja kortizola usmjerena ka mobilizaciji u energetske svrhe – povećanje plazmatskih koncentracija aminokiselina, glukoze, glicerola, te slobodnih masnih kiselina. Također, u konačnici kortizol djeluje protu-upalno i imunosupresivno<sup>28</sup>. Poremećena regulacija lučenja kortizola prisutna u stanjima kroničnog stresa, rezultira negativnim učincima.

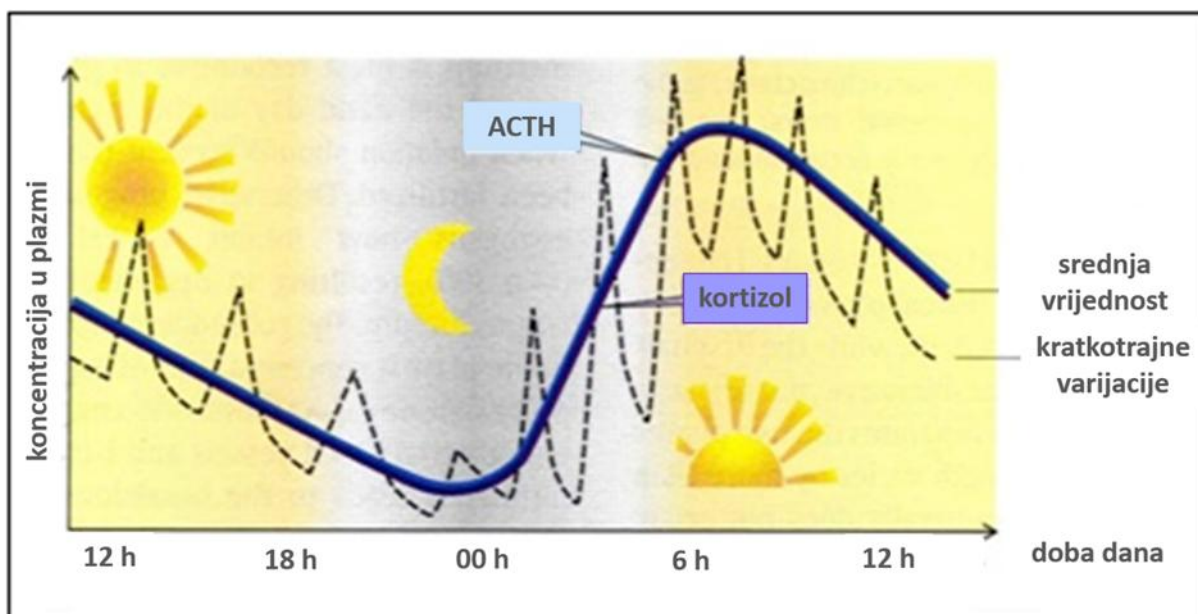
### 1.2.1 Cirkadijalni ritam lučenja kortizola

Današnja istraživanja aktivnosti HPAC osi prvenstveno su usmjerena na istraživanje cirkadijalnog ritma (lat. *circa* = oko, *dies* = dan) lučenja kortizola, u kojem su pojedine značajke cirkadijalnog (diurnalnog) lučenja važni indikatori fizioloških funkcija HPAC osi.

Cirkadijalni ritam lučenja kortizola nije prisutan prilikom rođenja, ali se pojavljuje tijekom prvih 18 mjeseci života, a Watamura i sur. (2004.) su pokazali da sazrijevanje same HPAC osi traje sve do treće godine života. Karakteristika cirkadijalnog ritma lučenja jesu visoke koncentracije kortizola pri buđenju. Nakon buđenja (30-45 minuta) slijedi znatan porast koncentracije kortizola (50-150 %), koji se naziva odgovor kortizola na buđenje (engl. *cortisol awakening response*, CAR), te značajan pad koncentracije tijekom dana (cirkadijalno smanjenje kortizola, engl. *diurnal cortisol slope* ili *decline*, DCS ili DCD), a najniža koncentracija kortizola je oko ponoći. Usprkos smanjenju koncentracije kortizola tijekom ostatka popodneva i večeri, nagib diurnalne krivulje relativno je manji u odnosu na jutarnje sate. Prolazno, nakon obroka, može se uočiti lagani porast koncentracije kortizola.

Razine kortizola u bazalnim uvjetima, bez stresa, osim što pokazuju robustan cirkadijalni ritam, pod utjecajem su i manje pravilnog ultradijalnog ritma, s kratkim pulsним intervalima od 90–120 minuta (otprilike 15 do 18 ciklusa dnevno)<sup>29,30</sup> (slika 1.5).

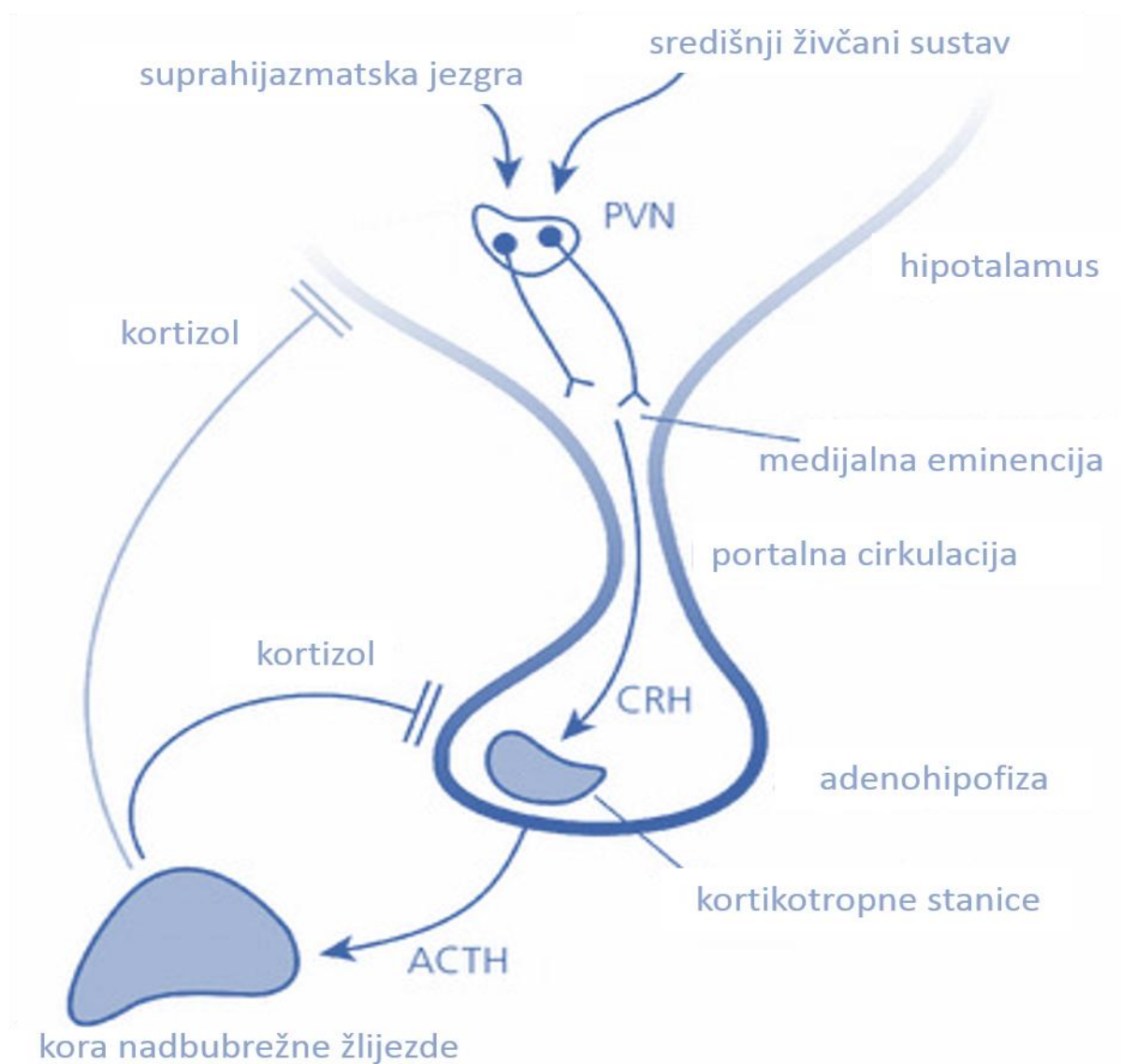
U ultradijalnom ritmu, frekvencije lučenja u jutarnjim satima ostaju iste, amplituda se pojačava što posljedično uzrokuje veće koncentracije kortizola u odnosu na ostatak dana. Ovaj porast kortizola potpomaže uzbuđenje i podržava odgovor organizma tijekom pripreme za nastavak dnevnih aktivnosti. Osobe s uobičajenim trajanjem noćnog spavanja i dnevnim aktivnostima imat će koncentracije kortizola najniže između 22 i 4 h ujutro kada je aktivnost HPAC osi utišana (najmanje 2,5 h do najviše 6 h dnevno). Standardiziran obrok, u skladu s cirkadijalnim ritmom, uzrokuje različite promjene koncentracije kortizola u krvi, ovisno o dobu dana, s najvećim porastom u vrijeme ručka. Isti standardizirani obrok konzumiran navečer izazvat će smanjen odgovor ili uopće neće biti porasta koncentracija kortizola. Jednako tako, nakon 30-minutnog intenzivnog vježbanja na traci, koncentracije kortizola izrazito su povećane u 7 h ujutro, dok je značajno manji porast uočen između 19 h i ponoći. Također, utišana aktivnost HPAC osi za vrijeme prvih nekoliko sati sna dokazana je i nakon intravenske stimulacije s CRH<sup>31</sup>. Sličan zaključak o cirkadijalnom ritmu dobiven je i u testovima simultane supresije u prvoj polovici sna s vazopresinom (ADH) i CRH.



**Slika 1.5** Cirkadijalni i ultradijalni ritam lučenja kortizola i ACTH (preuzeto i prilagođeno prema: <https://www.t-nation.com/img/photos/2011/11-693-01/FIGURE2.jpg>; 5. siječnja 2017.)

### 1.2.2 Kontrola izlučivanja kortizola i fiziološka regulacija cirkadijalnog ritma

Sedamdesetih godina prošlog stoljeća, zajedno s identifikacijom suprahijazmatske jezgre (engl. *suprachiasmatic nucleus*, SCN) kao najvažnijeg unutarnjeg čimbenika kontrole cirkadijalnog ritma, cirkadijalna sekrecija kortizola potvrđena je kao najvažniji ishod djelovanja<sup>32</sup>. U ljudi SCN sadržava oko 50000 neurona, a cirkadijalnost joj je autonomna i samoodržavajuća<sup>33</sup>. Jedna od najvažnijih funkcija SCN-a je sinkronizacija unutarnjih bioloških procesa s izmjenama ritma noći i dana.



**Slika 1.6** Regulacija aktivnosti HPAC osi (preuzeto i prilagođeno prema: Walker JJ, Spiga F, Waite E, Zhao Z, Kershaw Y, Terry JR, Lightman SL (2012) The origin of glucocorticoid hormone oscillations. PLoS Biology 10)

Regulacija aktivnosti HPAC osi i mehanizam lučenja kortizola prikazani su na slici 1.6. Paraventricularna jezgra hipotalamusa (engl. *paraventricular nucleus*, PVN) prima cirkadijalne kao i stresne impulse iz CNS-a (moždanog debla) i iz limbičkog sustava (kao što su hipokampus i amigdala), kao i iz SCN-a. Naime, impuls za lučenje kortizola je hormon koji se luči iz parvocelularne regije PVN-a i djeluje na aktivaciju adenohipofize, poznat kao hormon koji oslobađa kortikotropin (engl. *corticotropin-releasing hormone*, CRH)<sup>34</sup>.

Iz hipotalamusa CRH hipotalamičko-hipofiznim portalnim krvotokom dospijeva u adenohipofizu gdje potiče ACTH sekretorne stanice na sintezu i lučenje adenokortikotropnog hormona (engl. *adrenocorticotrophic hormone*, ACTH). Djelovanjem CRH na receptor (CRHR1) na stanicama adenohipofize potiče se ekspresija gena i sinteza pro-opiomelanokortina (engl. *pro-opiomelanocortin*, POMC) koji je prekursor ACTH. Treba naglasiti da CRH potiče i noradrenergijski prijenos inervacijom *locus coeruleus*. Kidanjem molekule POMC, u centralnu cirkulaciju se izlučuju tri molekule: ACTH,  $\beta$  lipotropin i  $\beta$  endorfini. Adenokortikotropni hormon tada iz sekretornih vezikula dospijeva u cirkulaciju i postiže svoje endokrino djelovanje na koru nadbubrežne žlijezde, točnije na zonu fascikulatu i retikularis koje sintetiziraju i izlučuju kortizol. Jednom sintetiziran, kortizol se otpušta u centralnu cirkulaciju (kao plazmatski kortizol) i tako dolazi u ciljna tkiva. Kortizol regulira aktivnost HPAC osi, stoga i vlastitu sintezu, mehanizmom negativne povratne sprege. Na takav način, djelovanjem na razini hipofize, inhibira sintezu i lučenje ACTH, dok na razini PVN-a inhibira izlučivanje CRH.

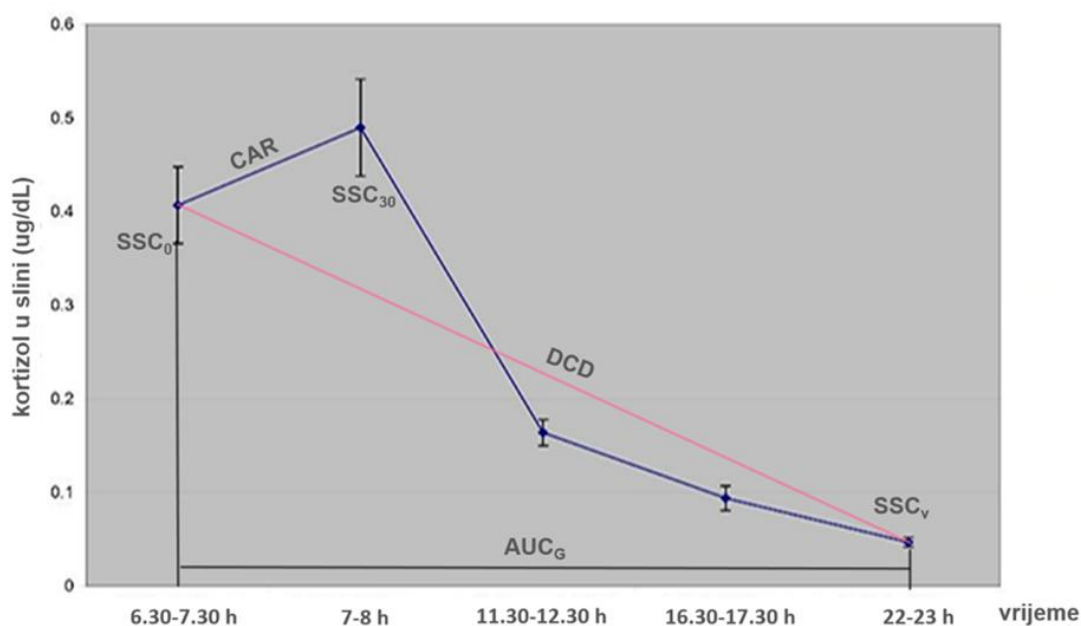
Izraziti cirkadijalni ritam lučenja kortizola znak je normalne fiziološke funkcije HPAC osi, dok su uočene devijacije uzrok ili utjecaja okolišnih čimbenika ili same uloge HPAC osi na razvoj poremećaja različitih organskih sustava<sup>35</sup>. Stoga se protokoli istraživanja baziraju na ponavljanim mjerenjima koncentracije kortizola kako bi procijenili cirkadijalne promjene i ukupnu koncentraciju kortizola u određenom vremenskom periodu. Dobar protokol u populacijskim istraživanjima morao bi dati pouzdane mjere koncentracija kortizola po buđenju, odgovor kortizola na buđenje, cirkadijalno smanjenje kortizola, površinu ispod krivulje dnevnog izlučivanja (engl. *area under the curve*, AUC<sub>G</sub>), te večernje koncentracije kortizola<sup>36</sup>.

Zaključno, stresna reakcija kompleksan je interaktivni, multidimenzijski odgovor na poticaje koji dovode do aktivacije brojnih neuronskih krugova unutar limbičkog sustava. To dovodi do promjena u ponašanju, promjena funkcije vegetativnog živčanog sustava, te izlučivanje različitih hormona, što posljedično znači i adaptacijsku regulaciju brojnih fizioloških funkcija<sup>37</sup>, pojačane mobilizacije energije prema mišićima i mozgu što uključuje

redistribuciju krvotoka i iskorištenje glukoze u mišićima i mozgu te pojačano disanje, inhibiciju reproduktivnih funkcija, smanjenje apetita i hranjenja, modulaciju imunostava, te usmjeravanje kognitivnih funkcija prema izvoru prijetnje. Aktivacija HPAC osi važan je mehanizam putem kojeg socijalni i psihološki čimbenici iz svakodnevnog života utječu na biologiju i zdravlje odnosno na fiziološke procese u organizmu. Aktivacija HPAC osi neophodna je i kod svakodnevne, zdrave adaptacije dok se ekstremna, učestala ili kronična aktivacija povezuje s negativnim zdravstvenim ishodima te posljedično s disfunkcijom i bolesti različitih sustava i organa.

### 1.2.3 Indeksi cirkadijalnog ritma lučenja kortizola

Razlike u dnevnim varijacijama koncentracija kortizola između pojedinih dana povezuju se s pojavnosti svakodnevnih stresora<sup>38</sup>. Povezanost bazalnih koncentracija kortizola odnosno cirkadijalnog ritma lučenja kortizola i koncentracija kortizola nakon aktivacije HPAC osi (engl. *cortisol reactivity*) nije u potpunosti objašnjena. Periodičke aktivacije HPAC osi i oslobađanje kortizola neophodni su za suočavanje sa svakodnevnim stresorima, a ukoliko je aktivacija učestala ili kontinuirana, doći će do promjena bazalnih koncentracija kortizola, bilo kronično niskih ili kronično visokih. Stoga su današnja istraživanja usmjerena prvenstveno na istraživanje promjena u bazalnim koncentracijama te cirkadijalnom ritmu (slika 1.7).



**Slika 1.7** Indeksi cirkadijalnog ritma lučenja kortizola (prilagođeno prema: Internal Salimetrics Data, [www.salimetrics.com/salivary-assay-kits](http://www.salimetrics.com/salivary-assay-kits))



### 1.2.3.1 Koncentracija kortizola po buđenju

Koncentracija kortizola po buđenju (SCC<sub>0</sub>, engl. *cortisol concentration at awakening*) indikator je lučenja kortizola prije buđenja, dobar je pokazatelj aktivnosti HPAC osi i pouzdan prediktor neuravnoteženih i/ili patoloških stanja<sup>39</sup>. Sva istraživanja koja bi obuhvatila mjerenja koncentracija kortizola u razdobljima neposredno nakon buđenja bila bi manjkava bez podataka o izlučivanju kortizola prije buđenja<sup>40</sup>.

### 1.2.3.2 Odgovor kortizola na buđenje

Odgovor kortizola na buđenje (CAR, engl. *cortisol awakening response*) predstavlja fiziološki odgovor na buđenje, definiran kao nagli porast koncentracija kortizola 30-45 minuta nakon buđenja (pozitivan CAR), ali je u određenim slučajevima moguć i pad koncentracije nakon buđenja (negativan CAR). Stoga, je CAR izdvojena, ali i karakteristična mjera cirkadijalnog ritma lučenja kortizola<sup>41</sup>. U zdravih osoba, u prvih 30-45 minuta po buđenju očekivani porast koncentracija kortizola je između 50 i 150 %, dok se u slijedećih 60-75 minuta očekuje pad koncentracija na vrijednost kao po buđenju.

Regulacija CAR-a odvojena je od mehanizama kontrole cirkadijalnog ritma kortizola. CAR se nalazi pod utjecajem hipotalamičke suprahijazmatske jezgre kao i zajedničke, fine regulacije HPAC osi i simpatičkog živčanog sustava s izravnom inervacijom kore nadbubrežne žlijezde. Pretpostavlja se kako je interakcija između funkcije SCN-a i regulacijskih mehanizama, koji kontroliraju funkciju HPAC osi, uzrok različite adrenalne osjetljivosti na ACTH, koja varira od smanjene prije buđenja do povećane u vremenu poslije buđenja, doprinoseći na taj način odgovoru kortizola nakon buđenja. Značenje CAR-a još nije potpuno razjašnjeno, premda se smatra da CAR ima značajnu ulogu u procesima potaknutim samim buđenjem, u promjenama koncentracija drugih hormona, reguliranju aktivnosti imunosnog sustava, kao i aktivaciji lokomotornog sustava i kognitivnih funkcija<sup>40</sup>. Istraživanja ukazuju da je CAR najvjerojatnije dio adaptacijskog odgovora organizma na buđenje, koji osigurava dostatnu količinu energije za suočavanje sa stresorima i postizavanje maksimuma funkcionalnosti tijekom dana. CAR je genski determiniran i mjera je za koju se u prvim istraživanjima smatralo da ne pokazuje intra-individualne razlike<sup>42</sup>. Štoviše, novija istraživanja otkrila su povezanost varijacija u CAR-u s kratkotrajnim stresorima, kao što je razlika između radnih dana i dana vikenda<sup>43</sup> i smjenskog rada<sup>44</sup>. Nadalje, istraživanje koje je proveo Mikolajczak sa suradnicima još više

mijenja percepciju CAR-a kao stabilnog individualnog svojstva, potvrđujući kako karakteristike osobnosti koje se smatraju zaštitnim psihološkim čimbenicima za ljudsko zdravlje (visoka razina sreće i niska razina stresa) mijenjaju vrijednosti CAR-a od dana do dana i povezuju se s fleksibilnim vrijednostima CAR-a (vrijednosti CAR-a koje su niže vikendom nego danima u tjednu). Negativni psihološki čimbenici, kao što su niska razina sreće te visoka razina stresa, povezani su s nefleksibilnim CAR-om (vrijednosti CAR-a koje su jednake tijekom svih dana u tjednu kao i vikendom)<sup>45</sup>.

Istraživanja intra-individualnih razlika u zdravih ispitanika pokazala su kako na CAR imaju utjecaja trenutne okolnosti kao i psihosocijalne varijable. To su između ostalog, vrijeme buđenja, prisutnost prirodnog svjetla, događaji od prethodnog dana, očekivanja događaja u danu koji slijedi, ovulacija, putovanja kroz različite vremenske zone, zloupotreba alkohola i sredstava ovisnosti<sup>46</sup>. Zanimljivo, istraživanja još uvijek nisu u potpunosti razotkrila kakav bi bio optimalan odgovor HPAC osi na proces buđenja. Štoviše, i povećani i sniženi CAR povezuju se i s dobrim i s lošim somatskim i psihološkim stanjima. Rezultati različitih istraživanja promjena CAR-a nisu dosljedni. Primjerice, ispitanici u određenim istraživanjima pokazuju statistički značajno veći CAR u odnosu na kontrole (Edwards i sur., 2003; Lieb i sur., 2004; Steptoe i sur., 2004; Therrien i sur., 2007), dok u drugim istraživanjima ispitanici imaju statistički značajno niži CAR u odnosu na kontrole (Kudielka and Kirschbaum, 2003; Bohmelt i sur., 2005; De Kloet i sur., 2006; Wirtz i sur., 2007) pa su potrebna daljnja istraživanja koja će dovesti do odgovora koje su zapravo referentne vrijednosti CAR-a. Dobro razumijevanje svakodnevne uloge CAR-a u zdravoj populaciji u svakom slučaju će pridonijeti razumijevanju i patofiziološke osnove različitih bolesti koje su povezane s disfunkcijom HPAC osi.

### **1.2.3.3 Cirkadijalno smanjenje kortizola**

Cirkadijalno smanjenje kortizola (DCD, engl. *diurnal cortisol decline*) mjera je koja odražava sposobnost organizma neke osobe da se postupno, tijekom dana, pripremi za nadolazeći san. Izračunata vrijednost predstavlja razliku između koncentracije jutarnjeg kortizola i kortizola prije spavanja (večernjeg kortizola), podijeljenu s vremenom proteklom između uzimanja dvaju uzoraka<sup>36</sup>. Treba dodatno napomenuti da je cirkadijalno smanjenje kortizola definirano kao linearni stupanj promjene koncentracije kortizola tijekom jednog cijelog dana, od jutra do večeri, bez CAR-a. Jutarnje (više) koncentracije kortizola u adolescenata imaju funkciju povećanja apetita, oslobađanja energije i stimuliranja procesa učenja i pamćenja, dok su

večernje, (niže) koncentracije kortizola značajne za uspavljivanje<sup>47</sup>. Jači diurnalni nagib linearne krivulje općenito se smatra indikatorom bolje, zdravije funkcije HPAC osi, dok se otupljeni diurnalni nagib povezuje s potencijalnom disfunkcijom HPAC osi i posljedično pojavnošću niza različitih bolesti kao što su debljina<sup>48</sup>, depresija<sup>49</sup>, dijabetes<sup>50</sup>, kardiovaskularne<sup>51</sup>, psihijatrijske<sup>52</sup> te maligne bolesti<sup>53,54</sup>. Otupljeni nagib krivulje implicira manji, sporiji pad koncentracija kortizola tijekom dana, koji može biti uzrokom ili relativno nižih koncentracija neposredno po buđenju ili relativno viših koncentracija tijekom popodneva ili večeri<sup>55</sup>.

#### **1.2.3.4 Površina ispod krivulje**

Površina ispod krivulje ( $AUC_G$ , engl. *area under the curve*) predstavlja mjeru ukupnog dnevnog lučenja hormona (od buđenja do odlaska na spavanje) dobivenu mjerenjem svih koncentracija kortizola tijekom cijelog dana (omeđeno ukupnom površinom ispod krivulje). Ukupno lučenje kortizola mjera je kumulativnog učinka kortizola na cijeli organizam tijekom dana<sup>47</sup>, a izračunava se pomoću trapezoidne formule po Pruessneru i suradnicima<sup>56</sup>. Trajno visok  $AUC_G$  može biti uzrokom “iscrpljivanja” različitih organskih sustava, što posljedično dovodi do strukturnih ili funkcionalnih promjena, koje mogu biti povezane s pojavnošću i/ili razvojem različitih bolesti<sup>57</sup>.

#### **1.2.3.5 Koncentracija kortizola neposredno prije lijezanja**

Koncentracija kortizola neposredno prije lijezanja ( $SCC_{večer}$ , engl. *cortisol concentration at bedtime*) jedan od dijagnostičkih testova Cushingove bolesti, a prema algoritmu Europskog endokrinološkog društva<sup>58</sup>. Golden i sur. (2013) su pokazali kako koncentracije kortizola prije spavanja dobro koreliraju s  $AUC_G$  te se stoga koncentracije večernjeg kortizola prije spavanja mogu smatrati mjerom ukupnog lučenja kortizola tijekom dana<sup>59</sup>. Isto istraživanje ukazuje kako bi se koncentracije pred spavanje ili koncentracije u 23 sata mogle koristiti kao pouzdana mjera koncentracija tijekom dana. Korištenje večernjih koncentracija, zajedno sa CAR-om, omogućilo bi procjenu i ukupnog lučenja i nagiba diurnalne krivulje.

Iz svega navedenog može se zaključiti kako bi uvođenje svih navedenih indeksa cirkadijalnog ritma lučenja kortizola ( $SCC_0$ , CAR, DCD,  $AUC_G$ ,  $SCC_{večer}$ ) u velika populacijska

istraživanja moglo omogućiti proširenje spoznaja o povezanosti HPAC osi s akutnim i kroničnim stresom, a vjerojatno i s nastankom različitih bolesti.

#### **1.2.4 Kovarijable lučenja kortizola**

Brojna istraživanja zdrave populacije dokazala su utjecaj različitih sociodemografskih i analitičkih varijabli te indikatora fizičkog zdravlja na lučenje kortizola.

Zbog cirkadijalnog ritma lučenja značajan utjecaj na koncentracije kortizola ima vrijeme prikupljanja uzoraka i vrijeme koje je proteklo od samog trenutka buđenja. Utjecaj vremena buđenja pokazan je na promjeni fiziološkog odgovora kortizola na buđenje, pri čemu je ranije vrijeme buđenja bilo povezano s većim CAR-om<sup>60</sup>.

Također, znatan utjecaj na koncentracije kortizola ima i spol ispitanika. U odnosu na muškarce žene su imale veće vrijednosti CAR-a i pokazale kasniji pad koncentracija kortizola ujutro<sup>61</sup>. U adolescenata, pak, istraživanja ukazuju na isti trend kao i u odraslih. Uz razlike prema spolu, potvrđene su i više vrijednosti jutarnjeg kortizola u starijih adolescenata u odnosu na mlađe<sup>62</sup>. Treba naglasiti kako su u nekoliko istraživanja dobiveni i donekle oprečni rezultati, budući da nisu uvijek uočene razlike među spolovima<sup>63</sup>.

Kao dodatna varijabla potvrđen je i dan prikupljanja uzoraka (dani u tjednu ili preko vikenda), no rezultati tih istraživanja nisu bili sasvim podudarni. Istraživanja odraslih ispitanika koji su bili u radnom odnosu pokazala su povećane koncentracije kortizola u radnom tjednu u odnosu na dane vikenda<sup>64</sup>, dok neka druga nisu potvrdila razlike po danima uzorkovanja<sup>65</sup>. Istraživanje koje su proveli Schlotz i suradnici pokazalo je veći CAR ukoliko su uzeti uzorci u danima u tjednu, u odnosu na dane vikenda<sup>66</sup>.

Indeks tjelesne mase pokazao se kao moguća varijabla utjecaja na koncentracije kortizola. Štoviše, iako postoje dokazi o pozitivnim korelacijama dobi, tjelesne mase i stupnja puberteta s koncentracijama kortizola u djece i adolescenata<sup>67</sup>, neka istraživanja nisu pronašla značajnu povezanost navedenih parametara s kortizolom<sup>62</sup>.

Uz navedene varijable niz je somatskih i psiholoških varijabli za koje je poznato da utječu na lučenje kortizola. To su, prije svega, primjena kortikosteroidnih lijekova<sup>68</sup>, obrasci prehrane<sup>69</sup>, količina kofeina u prehrani<sup>70</sup>, pušenje<sup>71</sup>, utjecaj godišnjih doba<sup>72</sup>, vježbanje<sup>73</sup>, te individualni odgovor na agresiju, stanje stresa, bol, nezadovoljstvo i negativne emocije<sup>38</sup>. Nadalje, kronične bolesti također mogu biti uzrok povećanih koncentracija kortizola dok se dobro zdravlje povezuje s višim CAR-om<sup>72</sup>. Zanimljivo, prema dostupnoj literaturi, pušenje se povezuje i s povećanim, i sa sniženim CAR-om, ali i bez ikakvog utjecaja na CAR<sup>74</sup>. Također, povećane koncentracije kortizola izmjerene su i u ispitanika s većim opterećenjima

na poslu ili općenito većom razinom stresa<sup>75</sup>, iako rezultati koji se odnose na povezanost životnih događaja i kortizola nisu dosljedni. U nekim je istraživanjima uočena povezanost životnih događaja s višim koncentracijama kortizola<sup>76</sup>, dok se u drugim ne pronalazi ta povezanost<sup>77</sup>.

### **1.2.5 Vrste uzoraka za laboratorijske analize kortizola**

Brojna istraživanja HPAC osi i kortizola većinom su bila usmjerena na prosječne mjere kortizola, uglavnom iz 24-satnog uzorka mokraće<sup>78</sup>. Mjerenja metabolita kortizola, posebice 17-hidroksikortikosteroida i 17-ketosteroida u urinu bila su među prvim dostupnim metodama za istraživanja HPAC osi šezdesetih godina prošlog stoljeća<sup>79</sup>. Novije tehnike omogućile su istraživačima izravno mjerenje samog kortizola, kao mjere slobodne frakcije u mokraći, koja sačinjava tek 2-3 % ukupnih metabolita u mokraći te 1 % od ukupne koncentracije slobodnog kortizola u krvi. Slobodni kortizol metabolizira se u jetri te se potom oko 70 % ovog biološki inaktivnog metabolita izlučuje mokraćom, približno 20 % stolicom preko žuči i oko 8 % preko kože. Prednost određivanja kortizola u uzorku mokraće je dobra procjena slobodnog, fiziološki aktivnog hormona, koji ne ovisi o koncentraciji CBG-a te procjena noćnih koncentracija kortizola, što može biti korisno za poremećaje u kojima je dnevno izlučivanje normalno, primjerice anksioznost i posttraumatski stresni poremećaj, PTSP<sup>80</sup>. Analize u mokraći također su poželjne ukoliko je cilj procijeniti ne samo koncentracije slobodnog kortizola već i njegove metabolite u mokraći<sup>81</sup>. Brojni su nedostaci mjerenja slobodnog kortizola u uzorku 24-satne mokraće, a jedinstvene mjere ne daju dovoljno informacija kad se radi o istraživanju akutnog stresa. Nadalje, fiziološki status bubrežnog sustava izrazito interferira s koncentracijama kortizola u mokraći. Ukoliko je brzina glomerularne filtracije manja od 30 ml/min, koncentracije kortizola mogu biti normalne, usprkos prisutnoj pojačanoj sintezi. Također, više od 95 % kortizola se metabolizira prije izlučivanja. Slobodni kortizol se stoga ne može smatrati samo rezultatom sinteze već i razgradnje u jetri. U djece i osoba s odstupanjem od prosječne površine tijela za tu populaciju rezultati se trebaju korigirati. Jednako tako u interpretaciji rezultata potrebno je uzeti u obzir i moguće predanalitičke pogreške tijekom sakupljanja mokraće.

Za razliku od 24-satne mokraće, slina predstavlja sve poželjniji uzorak za analize steroidnih hormona.

Slina je po kemijskom sastavu bistra, bezbojna vodena otopina (sadržava 90-99 % vode) bez okusa i mirisa, secernirana iz različitih žlijezda slinovnica s pH vrijednošću koji varira od 6

do 9<sup>82</sup>. Tri su para velikih žlijezda slinovnica s najvećom sekretornom aktivnošću: parotidna, submandibularna i sublingvalna. Također, postoji niz manje aktivnih žlijezda koje se nalaze u obrazima, usnama, jeziku i nepcu. Svaka od navedenih žlijezda sintetizira slinu koje se razlikuje volumenom i sastavom te je doprinos svake od njih u ukupnom sastavu sline različit. Za razliku od sintetiziranih i secerniranih analita u slini nastaloj iz sekretornih stanica žlijezda slinovnica (kao enzimi, mucini), dio otopljenih tvari u slini podrijetlom je iz seruma te slina, zapravo, predstavlja prirodni ultrafiltrat krvi. Brojni analiti čija se koncentracija mjeri u slini sastojci su i krvi (poput steroidnih hormona), a transportirani su u slinu ili filtracijom kroz uske prostore između acinusnih ili duktalnih stanica u žlijezdama slinovnicama ili procesom pasivne difuzije između acinusnih ili duktalnih staničnih membrana. Također, u sastavu sline nalaze se i komponente humoralnog i staničnog imuniteta (protutijela, sustav komplementa, citokini). Nadalje, u uzorku sline nalazi se i dostatan broj stanica pogodnih za izolaciju visoko kvalitetne DNA, koja može poslužiti za različita genska istraživanja<sup>83</sup>.

Mogućnost neinvazivnog uzimanja većeg broja uzoraka sline u naturalističkim uvjetima uvelike je povećala broj istraživanja aktivnosti HPAC osi i cirkadijalnog lučenja njenog krajnjeg produkta hormona kortizola. U slini se većinom nalazi slobodna, fiziološki aktivna frakcija kortizola pa uzorak sline sve češće predstavlja adekvatan biološki materijal u populacijskim i epidemiološkim istraživanjima. Dodatna prednost sline kao analitičkog uzorka je i isključivanje stresa izazvanog efektom venepunkcije ili cjelodnevnom sakupljanjem mokraće<sup>84,85</sup>. Koncentracija kortizola ne ovisi o brzini stvaranja sline, zato što kortizol penetrira iz krvi procesom pasivne difuzije u slinu<sup>86</sup>. Na koncentracije slobodnog kortizola u slini ne utječe sinteza prijenosnika u jetri (CBG-a i, u manjoj mjeri, albumina), koja u određenim fiziološkim, ali i patološkim stanjima može biti promijenjena, primjerice zbog primjene oralne kontracepcije, tijekom trudnoće te zbog bolesti jetre.

Protokol uzimanja uzoraka sline je jednostavan i neinvazivan, nema potrebe za angažiranjem obučenog medicinskog osoblja, nisu potrebni posebni uvjeti transporta i čuvanja, izostaje neželjeni efekt hemolize, a slina predstavlja i puno sigurniji materijal s obzirom na mogućnost prenošenja infektivnih bolesti. Također, višestruka mjerenja kortizola u svakodnevnom prilikama omogućavaju dobru procjenu bazalnih vrijednosti i dnevne krivulje, kao i usporedbu vrijednosti između pojedinih dana u tjednu te procjenu akutnog odgovora u stimulacijskim i supresorskim testovima, u eksperimentalnim uvjetima.

Koncentracije kortizola u slini koreliraju s koncentracijama slobodnog kortizola u krvi ( $r=0,87$ )<sup>87</sup> što treba interpretirati uzimajući u obzir da je u slini otprilike 14 % kortizola vezano za CBG. Također, budući da kortizol pasivnom difuzijom prelazi u slinu, neovisno o

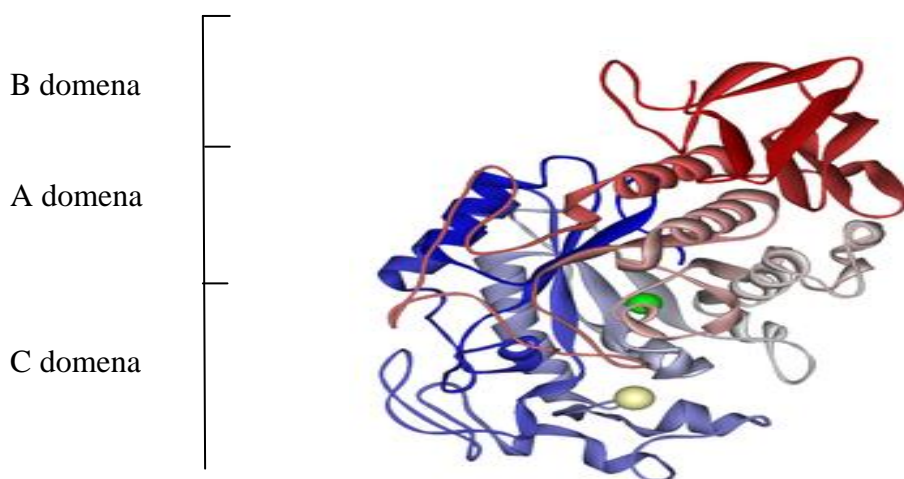
brzini nastajanja sline, dio kortizola prelazi u kortizon pa je koncentracija slobodnog kortizola u slini 10-35 % niža nego u krvi<sup>88</sup>. Korelacija s koncentracijom ukupnog kortizola u krvi je također visoka, a istraživanja su pokazala da je koeficijent korelacije između prosječne koncentracije kortizola u slini i krvi oko 0,67, no kod izrazito visokih koncentracija kortizola, kad su sva mjesta na CBG u krvi zauzeta, nagib regresijske krivulje korelacije više nije linearan<sup>88</sup>. Promjene u koncentracijama kortizola u krvi i slini sinkronizirane su. Tako se nakon intravenske primjene kortizola može uočiti povećanje koncentracije u slini nakon jedne minute<sup>89</sup> dok se vršna koncentracija u krvi uočava s odmakom od 2 do 3 minute u slini<sup>90</sup>.

Stvaranje i izlučivanje sline pod utjecajem je ciklusa izmjene dana i noći, pokreta pomicanja donje vilice, okusa i mirisa, jatrogenog utjecaja lijekova koji uzrokuju kserostomu (suhoću usta), jednako kao i medicinske intervencije (radijacija) i stanja (Sjörgenov sindrom) koji mijenjaju funkciju žlijezda slinovnica.

### 1.3 Amilaza

Izlučivanje sline pod utjecajem je različitih mehaničkih, kemijskih i psihičkih podražaja. Žlijezde slinovnice izravno su inervirane simpatičkim i parasimpatičkim neuronima te se aktivacija autonomnog živčanog sustava u stresnoj reakciji posredno može mjeriti aktivnošću enzima alfa-amilaze, koja se sintetizira u žlijezdama slinovnicama.

Amilaza je enzim koji pripada obitelji hidrolaza i široko je zastupljena u živim bićima, od mikroorganizama pa do sisavaca. Postoji u tri izoforme, kao  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ -amilaza. Alfa-amilaza katalizira hidrolizu škroba, glikogena, te poli- i oligosaharida dajući dekstrine, a zatim smjesu glukoze, maltoze i maltotrioze te male razgranate dekstrine koji su svi  $\alpha$ -anomerne strukture. Iako pronađena u brojnim humanim tkivima, najviše je zastupljena u slini i gušteračnom soku, u izoformi alfa-amilaze.



**Slika 1.8** Struktura  $\alpha$ -amilaze (preuzeto i prilagođeno prema: Ramasubbu N, Paloth V, Luo Y, Brayer GD, Levine MJ (1996) Structure of human salivary alpha-amylase at 1.6

A resolution: implications for its role in the oral cavity. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 52(Pt 3):435-46)

bačvice okruženi sa segmentima  $\alpha$  heliksa u istom konformacijskom okruženju. Unutar formacije  $\beta$  bačvice nalaze se tri aktivna mjesta sa kloridnim ionom. Karakteristika domene A, također je i da je sastavljena od dva segmenta polipeptidna lanca koji obuhvaćaju aminokiselinske ostatke od 1-99 i 169-404. Proteinska domena B sastoji se od aminokiselinskih ostataka 100-168, i nalazi se između trećeg  $\beta$  lanca i  $\alpha$  heliksa  $\beta$  bačvice domene A. Umatanjem, domena B čini vrećicu, džep oko strukture  $\beta$  bačvice domene A unutar koje je i vezani ion kalcija čija je primarna funkcija stabilizacija same strukture domene B. Proteinska domena C sastoji se od aminokiselinskih ostataka 405-496 koji čine stabilnu strukturu na suprotnoj strani domena A i B. Sklopljena je kao antiparalelna  $\beta$  jedinica koja je labavo vezana s domenom A<sup>91</sup>. Za domenom C je najznačajnije da je najrazličitija između alfa-amilaza različitog podrijetla, gušterače ili salivarne. Primarna sekvenca ove dvije amilaze je vrlo slična, s homologijom od 97 % i razlikom od samo 15 aminokiselina. Sve alfa-amilaze (sAA) sadrže barem jedan ion kalcija zbog održavanja strukturnog integriteta i enzimske aktivnosti, dok se puna aktivnost enzima postiže u prisustvu aniona, primjerice klorida, bromida ili nitrata.

Ljudski geni za sve izoforme amilaze nalaze se na 1. kromosomu (1p21), a sastoje se od klastera gena (AMY1A, AMY1B, AMY1C, AMY2A, AMY2B) koji su visoko izraženi i u žlijezdama slinovnicama i u gušterači. Geni AMY1A, AMY1B, AMY1C kodiraju izoenzim podrijetla iz žlijezda slinovnica, tzv. salivarnu amilazu. Tijekom evolucijskog razvoja geni za salivarnu amilazu se dupliciraju. U DNA hibridizacijskim istraživanjima pokazano da se u mnogih osoba u genima nalaze ponavljajući sljedovi (engl. *tandem repeats*). Broj kopija gena korelira s aktivnošću salivarne amilaze, a novija istraživanja povezuju aktivnost enzima s brojem kopija lokusa AMY1, što je posljedica adaptacijske prilagodbe na prehranu temeljenu na škrobu<sup>92</sup>.

Aktivnost salivarne amilaze inaktivira se u želucu, zbog izrazite kiselosti želučanog probavnog soka (pH=1-2). Ukoliko je pH želučanog soka oko 3,3 amilaza je kompletno inaktivirana tijekom 20 minuta na 37 °C. Sam škrob, kao i produkti djelovanja amilaze, kraći lanci glukoze, mogu djelomično spriječiti inaktivaciju amilaze želučanim sokom.



Kao što je već spomenuto, različiti analiti (hormoni i enzimi) nalaze se u slini, a njihove koncentracije i aktivnosti povezuju se s fiziološkom aktivacijom različitih sustava. Aktivacijom autonomnog živčanog sustava oslobađaju se katekolamini (adrenalin, noradrenalin i dopamin) u živčanom sustavu i u srži nadbubrežnih žlijezda, a među njihovim glavnim funkcijama su regulacija metabolizma, djelovanje na cirkulacijski sustav i obrana od posljedica stresa (adrenalin) te neurotransmitterska funkcija u središnjem i autonomnom živčanom sustavu (dopamin i noradrenalin). Adrenalin i noradrenalin, vezujući se na adrenergijske receptore, aktiviraju žlijezde slinovnice na lučenje salivarne alfa-amilaze. Količinski je amilaza najzastupljeniji enzim u slini, a njezino se lučenje iz žlijezda slinovnica većinom pripisuje simpatičkoj aktivnosti<sup>93</sup>. Time je omogućeno posredno mjerenje aktivnosti autonomnog živčanog sustava, posebice simpatikusa, mjerenjem aktivnosti alfa-amilaze u slini. Koncentracije  $\alpha$ -amilaze slijede cirkadijalni ritam lučenja, s nižim koncentracijama u jutarnjim satima, dok u ostatku dana rastu i postižu najviše vrijednosti navečer<sup>94</sup>.

Najvažnija fiziološka funkcija  $\alpha$ -amilaze je sudjelovanje u metabolizmu šećera, ali također i vezanje na bakterije usne šupljine te caklinske erozije zubi. Smatra se da je ključna uloga amilaze uspostava i održavanje oralne mikroflore i formiranje dentalnih plakova<sup>95</sup>. Izlučivanje  $\alpha$ -amilaze iz žlijezda slinovnica kontrolirano je impulsima iz autonomnog živčanog sustava, a posljedično aktivnost salivarne  $\alpha$ -amilaze korelira s aktivacijom simpatikusa tijekom stresne reakcije. Istraživanja su pokazala povećanu aktivnost sAA tijekom različitih stresnih stanja, bilo potaknutih biogenim, bilo psihosocijalnim stresorima<sup>96</sup>. Zanimljivo, istraživanja su pokazala da koncentracije kortizola ne koreliraju s aktivnosti sAA za vrijeme stresne reakcije<sup>93,94</sup>, što može navoditi na zaključak kako je aktivnost sAA povezana sa stresom neovisno o aktivaciji HPAC osi. Prva istraživanja aktivnosti sAA ukazala su na povezanost s koncentracijama katekolamina u krvi, posebice noradrenalina, kao i na pozitivnu korelaciju s koncentracijom noradrenalina tijekom stresnog odgovora<sup>94</sup>. Provedeni pokusi, opisani u literaturi, pokazali su da aktivnost sAA može biti inhibirana adrenergijskim  $\beta$ -blokatorom propranololom<sup>97</sup>, ali i aktivirana stimulirajućim agonistom, no bez povećanja brzine stvaranja sline<sup>98</sup>. Rezultati navedenih istraživanja ukazuju da isti stimulus koji aktivira simpatikus ujedno može potaknuti i njegovo djelovanje na žlijezde slinovnice. Odgovor sAA na stresni stimulus je kompleksan i izgleda da uključuje i aktivaciju parasimpatikusa u manjem obimu<sup>96</sup>. U istraživanju Bosch-a i suradnika iz 2011. godine pokazano je kako autonomni refleks aktivacije parasimpatikusa ka žlijezdama slinovnicama može dovesti i do neuočene aktivacije simpatikusa<sup>99</sup>. Kasnija su istraživanja dokazala kako odgovor sAA na stimulaciju u laboratorijskim uvjetima značajno korelira s koncentracijama noradrenalina, ali ne i

adrenalina u krvi. Povezanost noradrenalina i sAA bila je značajnija negoli povezanost noradrenalina i adrenalina međusobno, sugerirajući moguću ulogu sAA kao prediktivnog čimbenika<sup>100</sup>.

Stoga bi za potpuno razjašnjenje fizioloških procesa, koji utječu na aktivnost sAA, bila potrebna dodatna istraživanja, koja bi se temeljila na dosad poznatim činjenicama da je mjerenje aktivnosti sAA pogodna neinvazivna mjera aktivnosti autonomnog živčanog sustava i poveznica s nizom socijalnih, zdravstvenih i kognitivnih fenomena u ljudi<sup>101,102</sup>.

## 1.4 Genski biljezi stresnog odgovora

Istraživanja genskih biljega u genima za glukokortikoidne i mineralokortikoidne receptore mogla bi pridonijeti potpunijem razumijevanju fiziologije odgovora na psihološke i socijalne stresne poticaje. Rezultati novijih istraživanja ukazuju da se individualne različitosti u fiziološkom odgovoru na stres mogu povezati s polimorfizmima gena HPAC osi<sup>103, 104, 105</sup>. Budući da kortizol postiže svoje djelovanje vezanjem na dva receptora, mineralokortikoidni (MR), i glukokortikoidni receptor (GR) koji su ko-ekspimirani u neuronima limbičkih struktura, polimorfizmi gena za oba receptora (NR3C1 za GR i NR3C2 za MR) mogu biti odgovorni za inter-individualne različitosti.

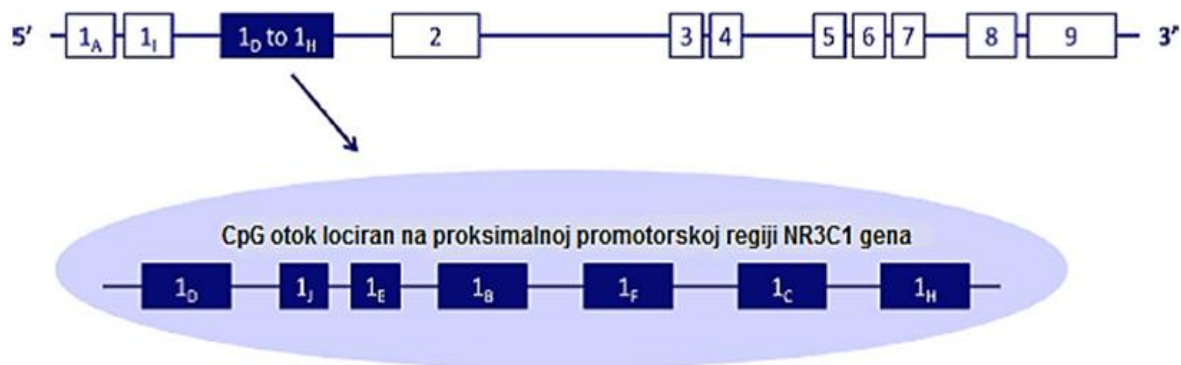
Dok su GR prisutni u skoro svakoj stanici u tijelu, MR se javljaju uglavnom u područjima mozga i to limbičkog sustava i hipokampusu. Afinitet kortizola za MR je puno veći nego za GR i postoji bazalna razina vezanja kortizola za MR dok se GR aktiviraju tek kod odgovora na stresor<sup>106</sup>. Oba tipa receptora zajedno utječu na koncentraciju kortizola<sup>107</sup>. Smatra se da mineralokortikoidni receptori uglavnom reguliraju početak aktivacije HPAC osi, dok glukokortikoidni receptori reguliraju terminaciju aktivnosti<sup>106</sup>.

### 1.4.1 Glukokortikoidni receptor (GR)

Glukokortikoidni receptor (GR) pripada superobitelji receptora steroidnih/tiroidnih hormona i retinoične kiseline i nalazi se u svim stanicama organizma. Prvi je dokazan i izoliran kao transkripcijski faktor, istražen u cijelosti i neophodan za ekspresiju gena osjetljivih na glukokortikoide (engl. *glucocorticoid-responsive genes*)<sup>108</sup>.

Ljudski gen za glukokortikoidni receptor smješten je na 5. kromosomu (5q31-32) i sadrži 8 translahiranih eksona (2-9) i 9 netranslahiranih alternativnih prvih eksona (slika 1.9). Svi ti alternativni prvi eksoni locirani su na jednoj od dvije promotorske regije: proksimalnoj ili

distalnoj promotorskoj regiji, koje se nalaze 5 kb i 30 kb uzvodno od transkripcijskog startnog mjesta. Alternativni prvi eksoni 1<sub>A</sub> i 1<sub>I</sub> su pod kontrolom promotora koji se nalaze u distalnoj promotorskoj regiji, dok se promotori eksona 1<sub>D</sub>, 1<sub>J</sub>, 1<sub>E</sub>, 1<sub>B</sub>, 1<sub>F</sub>, 1<sub>C</sub>, 1<sub>H</sub> nalaze u proksimalnoj promotorskoj regiji. Eksoni 1<sub>D</sub> i 1<sub>H</sub> pronađeni su u uzvodnom CpG otočiću<sup>109</sup>.



**Slika 1.9** Shematski prikaz strukture gena ljudskog glukokortikoidnog receptora GR/NR3C1 (preuzeto i prilagođeno prema: Palma-Gudiel H, Córdova-Palomera A, Leza JC, Fañanás L (2015) Glucocorticoid receptor gene (NR3C1) methylation processes as mediators of early adversity in stress-related disorders causality: a critical review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 55:520–535)

GR je strukturom 94 kD polipeptidni lanac koji ima dvije odvojene domene vezivanja, za DNA i za steroidne molekule. Modularni je protein koji sadrži transaktivacijsku domenu na N-terminalnom kraju, središnju DNA-vezujuću domenu, ligand-vezujuću domenu na C kraju i fleksibilno "zglobnu regiju".

Alternativnim prekrajanjem nastaju mRNA molekule čijom translacijom nastaju dvije izoforme polipeptidnog lanca GR- $\alpha$ ,  $\alpha$  i  $\beta$ . Razlika između ova dva osnovna oblika je u dijelu receptorskog proteina na C kraju. GR $\alpha$  ima 50 aminokiselina u aktivnom mjestu vezivanja liganda, dok se za 15 aminokiselina GR $\beta$  u istoj regiji ligand ne veže. Različita mjesta na kojima započinje translacija uzrokom su postojanja i dodatnih izoformi receptorskog proteina koje se razlikuju u dijelu na N kraju (GR $\alpha$ -A, GR $\alpha$ -B, GR $\beta$ -A, GR $\beta$ -B). U odsutnosti glukokortikoida, GR nalazi se u citoplazmi vezan za šaperon, kao što je protein toplinskog šoka 90 (Hsp90).

Glukokortikoidni hormon kortizol, kao i svi ostali steroidni hormoni, iskazuje svoje djelovanje na razini stanice povezujući se sa specifičnim receptorom u citoplazmi. Nakon što se kortizol vezao za GR $\alpha$  u citoplazmi, cijeli se kompleks konformacijski mijenja hiperfosforilacijom. Kompleks hormon-receptor se potom transportira u jezgru nakon čega se vezuje na specifične genske regije, zvane glukokortikoidni elementi odgovora (engl. *glucocorticoid response element*, GRE), koji su, zapravo, promotori transkripcije tisuća gena osjetljivih na glukokortikoide<sup>110</sup>. Nasuprot tome, GR $\beta$  ne vezuje glukokortikoidne hormone pa je transkripcijski neaktivan. Štoviše, Bamberger i sur. (1995) pokazali su da GR $\beta$  može inhibirati i djelovanje aktiviranog kompleksa GR $\alpha$ -hormon na ciljane gene. Inhibicijsko djelovanje posljedica je kompeticijskog natjecanja za ciljna vezna mjesta GRE<sup>111</sup>. Budući je metodom lančane reakcije polimerazom s reverznom transkripcijom (engl. *reverse transcription polymerase chain reaction*, RT-PCR), dokazana ekspresija mRNA GR $\beta$  u stanicama različitih ljudskih tkiva, GR $\beta$  bi mogao biti i fiziološki i patofiziološki značajan endogeni inhibitor djelovanja glukokortikoidnih hormona i biti povezan s različitom osjetljivošću tkiva na glukokortikoide.

Hagendorf i sur. (2005) pronašli su korelaciju između ekspresije GR, razine ekspresije mRNA i broja receptora. Zaključili su da je Cushingov sindrom povezan s reverzibilnim smanjenjem afiniteta za GR, što je možda povezano s povećanjem ekspresije GR $\beta$ , kao mogućim kompenzacijskim mehanizmom koji prati povećane koncentracije kortizola. Obrnuto, kronični hipokortizolizam, povezan je s adaptacijskim promjenama na razini samog broja GR-a<sup>112</sup>.

GR kontrolira transkripciju ciljnih gena na dva načina, izravno i neizravno. Izravna kontrola ostvaruje se interakcijom s regulacijskim elementima u molekuli DNA dok se neizravna ostvaruje međudjelovanjem s drugim transkripcijskim faktorima. Kao odgovor na različite poticaje, uključujući i stres, kortizol koordinira fiziološki odgovor metaboličkog, endokrinog, imunskog i živčanog sustava te osigurava adekvatnu transkripciju. GR u mozgu posreduje u moduliranju emocionalnog ponašanja i kognitivnih funkcija. Gubitak funkcije GR-a u živčanom sustavu uzrokuje poremećaj regulacije HPAC osi, što za posljedicu ima povećanje koncentracija glukokortikoida i simptomatologije koja se pronalazi u bolesnika s Cushingovim sindromom. Istraživanja na životinjama dokazala su značaj GR u živčanom sustavu i njegovu povezanost s emocionalnim obrascima ponašanja budući su životinje s mutiranim GR-om imale poremećen odgovor na stres i smanjenu anksioznost.

Nadalje, Wei i sur. (2004) također su pokazali da GR sudjeluje u modulaciji stupnja i stabilnosti emocija i samih karakteristika emocionalnog odgovora. U istraživanju, koje je provedeno na transgeničnim miševima s prekomjernom ekspresijom GR-a dokazano je da ti

miševi iskazuju značajni porast anksioznog i depresivnog ponašanja u odnosu na divlji tip i, također, pokazuju pretjeranu osjetljivost na antidepresive i kokain. Zaključno, miševi s prekomjernim izražajem GR-a imaju konzistentno jaču reaktivnost i u pozitivnim i negativnim eksperimentalnim testovima emotivnosti<sup>113</sup>.

Danas se u mnogim genskim istraživanjima koriste genski biljezi koji se nalaze u podlozi nekih bolesti, a polimorfizam jednog nukleotida (SNP, engl. *single nucleotide polymorphism*) jedan je od najčešće korištenih. SNP-ovi su jedni od najčešćih polimorfizama u ljudskom genomu, a temelje se na promjeni samo jednog nukleotida (jedne baze).

Prve polimorfizme u genu za GR opisao je Koper i sur. (1997). Prva točkasta mutacija, izmjena G u A u kodonu 22, tiha je mutacija, gdje oba kodona (GAG i GAA) kodiraju za glutaminsku kiselinu<sup>114</sup>. Slijedeća opisana točkasta mutacija obuhvaća promjenu aminokiseline arginin u lizin (AGG AAG) u kodonu 23. Van Rossum i sur. (2002) pronašli su poveznicu ovog polimorfizma s rezistencijom na glukokortikoidne hormone (GCCR; 615962)<sup>115</sup>.

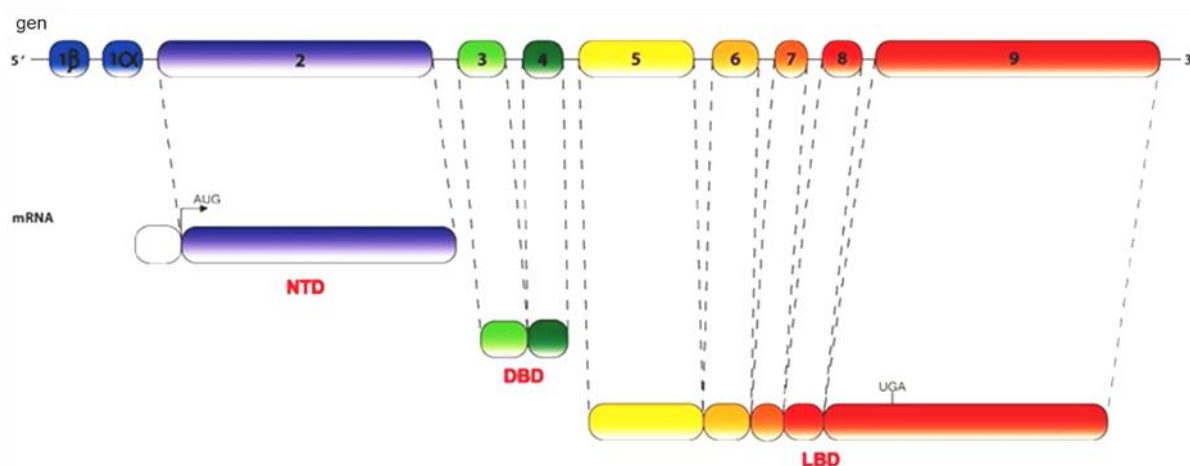
Polimorfizme R23K (ER22/23EK) i N363S u GR-u istraživali su i Finken i sur. (2007) i pokazali njihovu povezanost i sa sniženom i s povećanom osjetljivošću na kortizol. Polimorfizmi gena NR3C1 ER22/23EK (rs1689 i rs6190) predstavljaju dvije povezane promjene nukleotida u kodonima 22 i 23<sup>116</sup>. Smanjenje ekspresije glukokortikoidnih receptora i odgovora na glukokortikoide može rezultirati povećanjem upalnog djelovanja, zabilježenog u depresiji<sup>117</sup>. Prisutnost ER22/23EK rjeđeg alela povezana je s relativnom rezistencijom glukokortikoida, povećanjem osjetljivosti na inzulin i smanjenjem koncentracije ukupnog kolesterola i LDL<sup>118</sup>. Pokazano je da genski polimorfizmi za GR utječu na reaktivnost HPAC osi, kao i da je kronična disregulacija HPAC osi povezana s razvojem nekoliko psihijatrijskih poremećaja. Povezanost funkcionalnih polimorfizama u NR3C1 i poremećaja deficita pažnje i hiperaktivnog poremećaja (engl. *Attention Deficit Hyperactivity Disorder*, ADHD) potvrđena je u nekim istraživanjima, što predstavlja dodatan genetički dokaz uključenosti HPAC osi kod poremećaja i odgovora na liječenje ove bolesti<sup>119</sup>.

#### **1.4.2 Mineralokortikoidni receptor (MR)**

Mineralokortikoidni receptor (MR) pripada obitelji receptora smještenih u jezgri. Fiziološko djelovanje kao transkripcijskog faktora ostvaruje posredovanjem preko hormona aldosterona na ciljna tkiva (bubreg, kolon, kardiovaskularni i centralni živčani sustav, te smeđe masno tkivo). MR posjeduje jednak afinitet za mineralo- i za glukokortikoidne hormone, te može

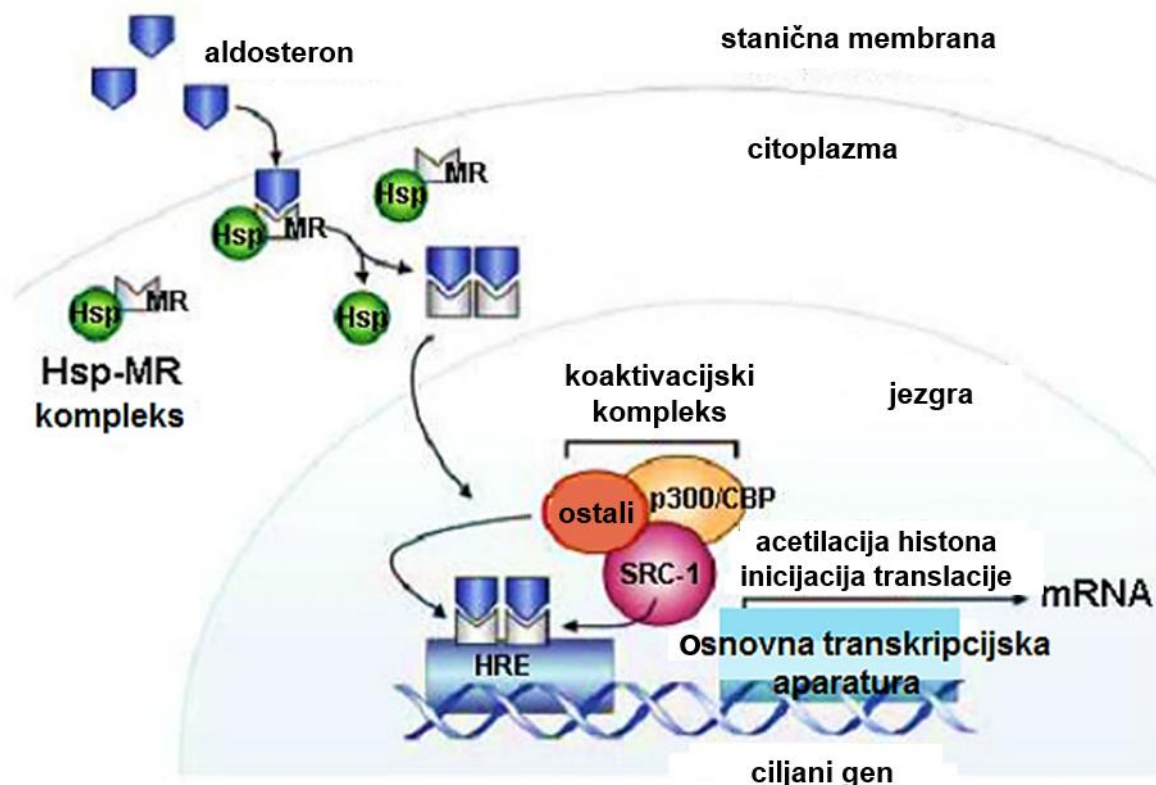
djelovati kao glukokortikoidni receptor s visokim afinitetom vezivanja<sup>120</sup>. Osim visokog afiniteta vezivanja aldosterona i kortizola, ovaj receptor s visokim afinitetom veže i progesteron<sup>121</sup>. Budući da su cirkulirajuće koncentracije glukokortikoida nekoliko puta veće od koncentracija mineralokortikoida u krvi, aktivacija MR glukokortikoidima fiziološki je značajna.

Gen za MR lociran je na kromosomu 4 (4q31.1; 4q31.2), sastoji se od približno 400 kb i sadrži 10 eksona, osam transliranih eksona (2-9) i dva netranslatirana prva eksona, MR $\alpha$  i MR $\beta$ <sup>122</sup> (slika 1.10).



**Slika 1.10** Shematski prikaz strukture gena ljudskog mineralokortikoidnog receptora MR/NR3C2 (preuzeto i prilagođeno prema: Fabio FD, Gottlieb B, Beitel LK, Trifiro M (2009) Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology 13:858-860)

Sintetizirani protein, molekulske mase 107 kD, sastoji se od 984 aminokiseline. Kao i glukokortikoidni receptor, mineralokortikoidni receptor ima 3 glavne funkcionalne domene: modulirajuća regija koja veže DNA bogata cisteinskim ostatcima na N-terminalnom kraju, središnja domena koja veže DNA i C domenu koja veže ligand na C kraju. MR pronalazimo u tkivima s djelovanjem mineralokortikoidnih hormona, kao što su ponajprije bubrezi i crijeva, ali i mozak, hipofiza, hipokampus i srce. U odsutnosti liganda, MR je smješten u citoplazmi u kompleksu s šaperonima poput proteina toplinskog šoka 90. Imunoflorescentne analize potvrdile su citoplazmatsko lokalizaciju MR, a tek se vezivanjem aldosterona aktivira receptor i dolazi do translokacije kompleksa u jezgru (slika 1.11). Zennaro i sur. (1995) identificirali su dvije varijante prekrajanja nastale alternativnim prekrajanjem, alfa i beta, koje sadržavaju alternativni prvi ekson. Kodirajuća regija koja započinje u eksonu 2 identična je i u MR $\alpha$  i  $\beta$ .



**Slika 1.11** Shematski prikaz signalizacije MR-a (preuzeto i prilagođeno prema: Alt SR. The glucocorticoid receptor: transcriptional regulation and epigenetic programming, doctoral thesis, University of Trier, Germany, 2011)

U istraživanjima provedenim na miševima, kojima su odstranjeni MR u mozgu pronađen je poremećaj učenja i orijentacije u prostoru. Miševi su pokazivali hiperaktivno zanimanje prema novim objektima, ali uz normalnu anksioznost. Odrasli mutirani miševi imali su normalan cirkadijalni ritam aktivnosti HPAC osi<sup>123</sup>.

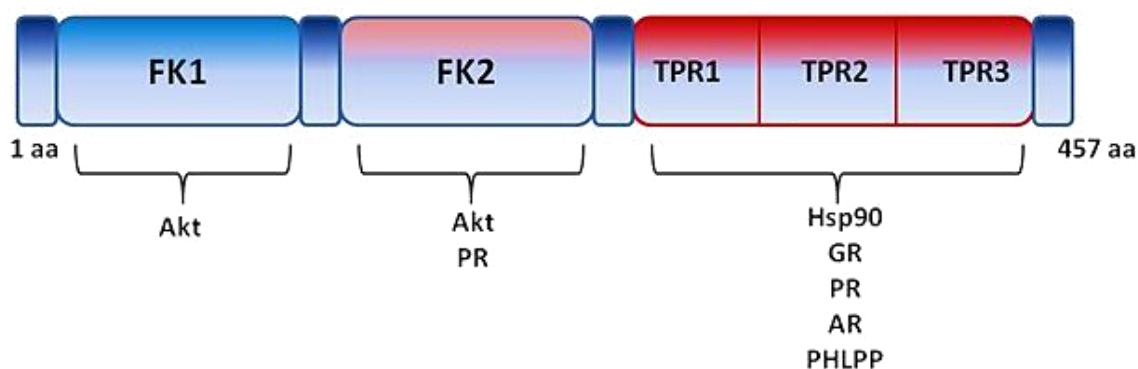
Polimorfizam rs5522 gena NR3C2 uključuje izmjenu izoleucina u valin [izo(A)/val(G)]. Podaci pokazuju da je alel G uključen u smanjenu transaktivaciju povezanu s kortizolom, kao i s varijabilnošću funkcije MR-a. Istraživanja potvrđuju da pojedine polimorfne varijante rs5522 mogu utjecati na srčanu pregradnju i na razinu aldosterona u bolesnika s hipertenzijom rezistentnom na lijekove, a također utječe na regulaciju krvnog tlaka u bolesnika s primarnom hipertenzijom liječenih enalaprilom<sup>124,125</sup>. Nadalje, nositelji alela G mogu biti osjetljivi na različite stresne životne događaje te imaju povećavan rizik za razvoj depresije, deficita pažnje i kognitivnog deficita<sup>126,127</sup>.

DeRijk i sur (2006) istraživali su ulogu polimorfizma rs5522 (I180V) u neuroendokrinom odgovoru na psihosocijalne stresore, ali i u regulaciji elektrolita. Autori su pronašli da nositelji alela G, kao odgovor na stimulaciju u Trier Social Stress Testu, imaju više koncentracije i salivarnog i plazmatskog kortizola te broj otkucaja srca u odnosu na one ispitanike s alelom A. *In vitro* istraživanja alela 180V pokazala su blagi gubitak funkcije MR-a prilikom primjene kortizola kao liganda, u usporedbi s alelom A. Zaključak istraživanja bio je da psihosocijalni stresori u nositelja alela G značajno povećavaju koncentraciju kortizola i broj otkucaja srca<sup>128</sup>.

### 1.4.3 FK506-vezujući protein 5 (FKBP5)

FK506 vezujući protein 5 (FKBP5) je protein veličine 51 kD, kojeg pronalazimo u gotovo svim tkivima osim mozga, kolona i pluća. Član je obitelji imunofilina i igra važnu ulogu u imunoregulaciji i regulaciji osnovnih staničnih procesa, uključujući nabiranje i transport proteina. Ko-regulacijski je to protein kojeg povezujemo s mehanizmom negativne povratne sprege, ključnog procesa za konačan odgovor HPAC osi na stres. Veže se za GR i mijenja njegovu sposobnost da reagira na naznaku stresa<sup>129</sup>.

Gen *FKBP5* smješten je na 6. kromosomu (p21.31), čijom transkripcijom nastaju četiri različite varijante.



**Slika 1.12** Tri funkcionalne domene FKBP5 (preuzeto i prilagođeno prema: Ellsworth KA, Wang L (2013) Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology 18: 314-320)

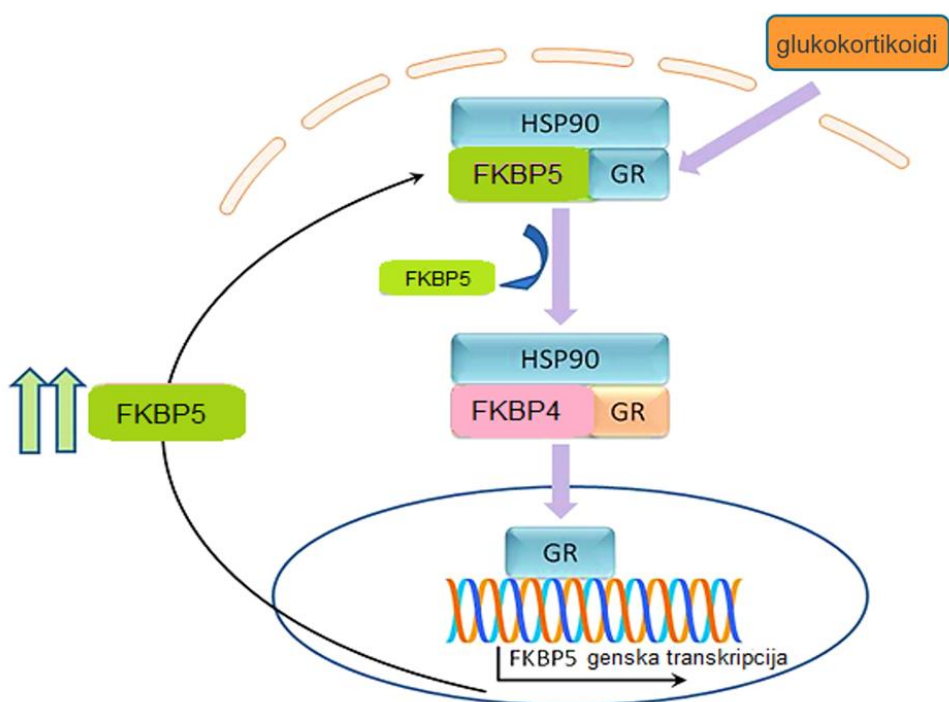
U studiji iz 2003. Sinars i suradnici su pokazali kako se struktura proteina FKBP5 sastoji od 457 aminokiselina i tri funkcionalne domene<sup>130</sup> (slika 1.12). Domena FK1, koja se nalazi na N terminalnom kraju, ima rotamaznu aktivnost i koja djeluje kao peptidil-prolil izomeraza



(*PPIaza*), a također je odgovorna i za vezivanje Akt kinaze. Domena FK2 je značajna za međudjelovanje s nizom veznih proteina te ne posjeduje PPIaznu aktivnost. Treća domena TPR sastoji se od tri slijeda od po 34 aminokiseline i uključena je u brojne interakcije među proteinima, primjerice s proteinom toplinskog šoka Hsp90<sup>131</sup>, receptorskim proteinom za progesteron<sup>132</sup>, enzimom fosfatazom bogatom ponavljajućim leucinskim sljedovima (*PHLPP*)<sup>133</sup>.

Djelovanje kortizola kompleksno je i uključuje niz ko-regulacijskih proteina, kao što je FKBP5, koji regulira aktivnost glukokortikoidnog receptora. Kada je FKBP5 vezan za GR-Hsp90 kompleks, receptor ima niži afinitet prema glukokortikoidima, što uzrokuje povećanje količine glukokortikoida u izvanstaničnom okruženju. S druge strane, jednom kada se glukokortikoidi vežu za navedeni kompleks, FKBP5 se odvaja i zamjenjuje s FKBP4<sup>134</sup>. Takva preuredba kompleksa omogućuje njegovu traslokaciju u jezgru gdje iskazuje fiziološko djelovanje kao transkripcijski faktor. GR također djeluje i na glukokortikoidne elemente odgovora GRE koji su, zapravo, promotori transkripcije, povećavajući transkripciju njihovog gena, što u konačnici uzrokuje povećanje FKBP5 proteina u stanici.

Na taj se način smanjuje afinitet GR za glukokortikoide putem FKBP5. Zaključno, FKBP5 snižava sistematsku osjetljivost na kortizol i negativnu povratnu spregu HPAC osi<sup>129</sup> posredovanu GR. (slika 1.13).



**Slika 1.13** Negativna povratna sprega na osjetljivost glukokortikoidnog receptora (GR). (preuzeto i prilagođeno prema: prema Ellsworth KA, Wang L (2013) Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology 18: 314-320)

Budući da GR ima ulogu u regulaciji odgovora na stres, a ako je ekspresija FKBP5 promijenjena, to može potencijalno doprinijeti razvoju poremećaja raspoloženja, poput depresije ili posttraumatskog stresnog poremećaja<sup>134</sup>. Polimorfizam rs1360780 gena za FKBP5 (zamjena C/T) povezuje se s promjenama u ekspresiji ili funkciji FKBP5, te s poremećenom regulacijom kod ponavljajućih stresnih epizoda<sup>135</sup>.

Također, Binder i sur. (2004) otkrili su povezanost odgovora na terapiju i povratnih depresivnih epizoda s polimorfizmima jednog nukleotida u FKBP5. Polimorfizmi su bili povezani s pojačanom staničnom ekspresijom FKBP5 proteina, što je mogući pokretač adaptacijskih promjena u glukokortikoidnom receptoru i regulaciji same njegove aktivnosti te posljedično samoj regulaciji HPAC osi. Osobe koji su nositelji alela T u genu FKBP5 (rs1360780) tijekom depresivnih epizoda imaju manju reaktivnost HPAC osi. Binder i sur. zaključili su da su promjene u regulaciji HPAC osi ovisne o polimorfizmu FKBP5 povezane s bržim odgovorom na terapiju antidepresivima i češćim ponavljanjima depresivnih epizoda<sup>136</sup>. Polimorfizam rs1360780 gena za FKBP5 je jedini SNP među polimorfizmima ovog gena koji je pokazao funkcionalne učinke. Potvrđena je povezanost rs1360780 s promjenom odgovora HPAC osi i s razvojem psihijatrijskih poremećaja povezanih sa stresom, kao što je posttraumatski stresni poremećaj. Polimorfizam rs1360780 također je povezan i s odgovorom na liječenje s antidepresivima, a bolesnici nositelji alela C imaju veću uspješnost standardiziranog liječenja<sup>137</sup>. Gen FKBP5 uključen je u regulaciju osjetljivost GR-a te je u nekim istraživanjima navedeni polimorfizam doveden u izravnu vezu s velikim depresivnim poremećajem<sup>138</sup>.

Posljednjih godina se za različita istraživanja u velikim populacijama sve više koristi DNA izolirana iz uzoraka sline. Pokazalo se da se iz uzoraka sline prikupljenih za populacijska istraživanja može izolirati DNA i dobiti rezultati genskih polimorfizama koji će doprinijeti istraživanju epigenetičkih fenomena u adolescenata<sup>139</sup>. Štoviše, isti uzorak sline može se koristiti za imunokemijske (analiza hormona) i kinetičke analize enzima, kao i za izolaciju DNA i analizu polimorfizama, što je, uz jednostavnost i neinvazivnost prikupljanja, učinilo uzorak sline jednim od najpoželjnijih uzoraka i za genetička istraživanja.

## 2 OBRAZLOŽENJE TEME

Disfunkcija HPAC osi povezuje se s nizom različitih poremećaja zdravlja, koji nastaju kao posljedica kroničnih stresnih reakcija i trajne aktivacije osi. Tijekom posljednja dva desetljeća postignut je značajan napredak u razumijevanju interakcije stresnog podražaja, funkcija HPAC i SAM osi te koncentracija kortizola i aktivnosti alfa-amilaze, ali brojna pitanja još uvijek ostaju otvorena. Posebice je značajno poznavanje uzroka i mehanizama koji povezuju kronični stres u svakodnevnom životu s nastankom bolesti i to naročito tijekom adolescencije zbog mogućeg prepoznavanja osoba s predispozicijom za razvoj bolesti u odrasloj dobi. Današnja istraživanja aktivnosti HPAC osi prvenstveno su usmjerena na istraživanje cirkadijalnog ritma lučenja kortizola, u kojem su pojedine značajke diurnalnog lučenja važni indikatori fizioloških funkcija HPAC osi. Relativno je mali broj istraživanja cirkadijalnog ritma lučenja kortizola i aktivnosti alfa-amilaze proveden na adolescentskoj, zdravoj populaciji u naturalističkim uvjetima, a nema dostupnih niti referentnih intervala.

U ovom su istraživanju analizirani salivarni biljezi stresa u reprezentativnom uzorku maturanata iz javnih srednjih škola u četiri najveća grada u Hrvatskoj. Radi se o posebno osjetljivoj skupini adolescenata izloženih brojnim univerzalno zahtjevnim psiho-socijalnim stresorima vezanim uz tranziciju u odraslu dob, pripreme za ispit državne mature i uz nastavak obrazovanja u visokoškolskim ustanovama.

Stoga je cilj ove doktorske disertacije:

1. Odrediti koncentraciju salivarnog kortizola u tri vremenske točke (po buđenju, 30 do 45 minuta nakon buđenja te neposredno prije lijeganja), indekse cirkadijalnog ritma lučenja kortizola te aktivnost salivarne alfa-amilaze neposredno po buđenju u zdravoj populaciji maturanata, u bazalnim i nekliničkim uvjetima.
2. Istražiti povezanost salivarnih biljega sa subjektivnim procjenama stresa u sedam domena svakodnevnog života te strategijama suočavanja sa stresorima tipičnim za adolescentu dob.
3. Definirati referentne intervale koncentracija salivarnog kortizola, indeksa cirkadijalnog ritma lučenja kortizola i aktivnosti salivarne alfa-amilaze u zdravoj populaciji maturanata.
4. Ispitati gensku podlogu individualnih različitosti u fiziološkom odgovoru HPAC osi u bazalnim uvjetima analizom polimorfizama jednog nukleotida (SNP-a) rs5522 u genu

za mineralokortikoidni receptor (*NR3C2*), dvojnog SNP-a rs6189/rs6190 u genu za glukokortikoidni receptor ER22/23EK (*NR3C1*) te SNP-a rs1360780 u genu za FK506 vezujući protein 5 (*FKBP5*).

Pretpostavke ovog istraživanja salivarnih biljega stresa u populaciji maturanta iz Hrvatske, su sljedeće:

1. Očekuju se statistički značajne razlike koncentracija salivarnog kortizola, indeksa cirkadijalnog ritma lučenja salivarnog kortizola i aktivnosti salivarne alfa-amilaze u poduzorcima razvrstanim prema spolu, a koje su uvjetovane strukturnim razlikama u limbičkim dijelovima mozga, različitostima kognitivne interpretacije stresnih podražaja, kao i koncentracijama spolnih hormona i globulina koji veže kortikosteroide.
2. Očekuju se statistički značajne razlike u koncentraciji salivarnog kortizola, indeksima cirkadijalnog ritma lučenja salivarnog kortizola i aktivnosti salivarne alfa-amilaze u učenika koji su pohađali različite tipove škola (gimnazije vs. strukovne škole) i različite turnuse (prije- vs. poslijepodnevni turnus), zbog različitog opterećenja školskim obvezama u različitim tipovima srednjih škola te drugačijeg ritma buđenja i lijevanja u dva turnusa u kojima se odvija školska nastava i izvanškolske aktivnosti.
3. Očekuje se povezanost procjene stresa i suočavanja sa stresom s koncentracijom salivarnog kortizola i indeksima cirkadijalnog ritma lučenja salivarnog kortizola te u manjoj mjeri s aktivnosti salivarne alfa-amilaze, s obzirom na činjenicu da je HPAC os primarni medijator transakcijskog odnosa pojedinca i okoline, koja se posebice aktivira tijekom izloženosti stresorima u svakodnevnom životu.
4. Očekuju se razlike po spolu u povezanosti procjene stresa, suočavanja sa stresom, koncentraciji salivarnog kortizola, indeksima cirkadijalnog ritma lučenja salivarnog kortizola te aktivnosti alfa-amilaze zbog spolnih razlika u procjenama stresa u adolescenciji te različitoj učestalosti pojedinih stilova suočavanja sa stresom.
5. Ne očekuju se statistički značajne razlike učestalosti alela i genotipova polimorfizma rs5522 u *NR3C2* genu, dvojnog polimorfizma rs6189 i rs6190 u ER22/23EK (*NR3C1*) genu te polimorfizma rs1360780 u *FKBP5* genu u ukupnom uzorku ispitanika i/ili u odvojenim poduzorcima učenika i učenika.
6. Očekuju se statistički značajne razlike u koncentracijama kortizola i indeksa cirkadijalnog ritma lučenja (fenotipskim varijablama) u ovisnosti o genotipovima istraživanih polimorfizama u ukupnom uzorku ispitanika i u odvojenim poduzorcima

učenica i učenika, budući da polimorfizmi gena HPAC osi utječu na inter-individualne razlike u stresnom odgovoru na psihološke i socijalne stresne poticaje.

## 3 MATERIJALI I METODE

### 3.1 Ispitanici

Prikupljanje podataka i uzoraka odvijalo se kroz dvije faze, u okviru presječnog istraživanja provedenog u sklopu projekta „Modernizacijski stres, mladi i migracije“ (09.01/408), kojeg je financirala Hrvatska zaklada za znanost.

Ispitanici su bili učenici trećih i četvrtih razreda gimnazija i strukovnih javnih srednjih škola iz četiri najveća grada u Hrvatskoj: Zagreba, Splita, Rijeke i Osijeka. Kako bi se prikupio stratificirani, reprezentativan uzorak ciljane populacije učenika primijenjen je model probabilističkog dvoetapnog klusterskog uzorkovanja (engl. *probabilistic two-stage cluster sample*)<sup>140</sup>, uz kontrolu tipa škole i grada u kojem se škola nalazi. Škole koje su sudjelovale u prvoj fazi istraživanja uzorkovane su s vjerojatnošću koja je proporcionalna njihovoj veličini, dobivenoj s popisa svih javnih škola. Dakle, škole su birane prema veličini, a svi učenici su imali jednaku vjerojatnost biti odabrani. U konačnici, u istraživanju su sudjelovali učenici iz 26 javnih srednjih škola: 6 strukovnih škola i 5 gimnazija iz Zagreba, 3 strukovne škole i 2 gimnazije iz Splita, 3 strukovne škole i 2 gimnazije iz Osijeka te 3 strukovne škole i 2 gimnazije iz Rijeke. Učenici su obaviješteni o istraživanju tijekom prve faze istraživanja, te neposredno prije druge faze, uz pomoć stručnih djelatnika škole (psihologa i pedagoga) i profesora biologije. U istraživanje su uključeni punoljetni učenici koji su dobrovoljno pristali sudjelovati u istraživanju, a nakon potpisivanja informiranog pristanka. Maloljetni učenici, koji su željeli sudjelovati u istraživanju, bili su obvezni donijeti informirani pristanak kojeg su potpisali njihovi roditelji i/ili skrbnici.

Tijekom prve faze terenskih istraživanja (od travnja do prosinca 2014.) prikupljali su se kvalitativni i kvantitativni antropološki i etnografski podaci (pomoću polu-strukturiranih dubinskih intervjua i fokus skupina) kako bi se istražili procesi sazrijevanja i socijalizacije učenika u tranzicijskom životnom razdoblju prijelaza iz srednjoškolskog u visokoškolsko obrazovanje ili na tržište rada. Ova je faza istraživanja obuhvaćala ispitanike koji su pohađali treće razrede srednje škole, a za sudjelovanje u istraživanju bili su izabrani slučajnim odabirom kako bi predstavljali sve društvene kategorije u njihovoj školi. U prvoj fazi istraživanja sudjelovalo je 673 učenika (dob 16-21, medijan 18).

U drugoj fazi terenskih istraživanja (od siječnja do ožujka 2015.) provedeno je ispunjavanje pripremljenih upitnika, biometrijska mjerenja te davanje uzoraka sline. Svi učenici četvrtih

razreda odabranih srednjih škola bili su pozvani na sudjelovanje u drugoj fazi istraživanja. Ukupno 1833 učenika četvrtih razreda (dob 17-22, medijan 19) je sudjelovalo u drugoj fazi istraživanja.

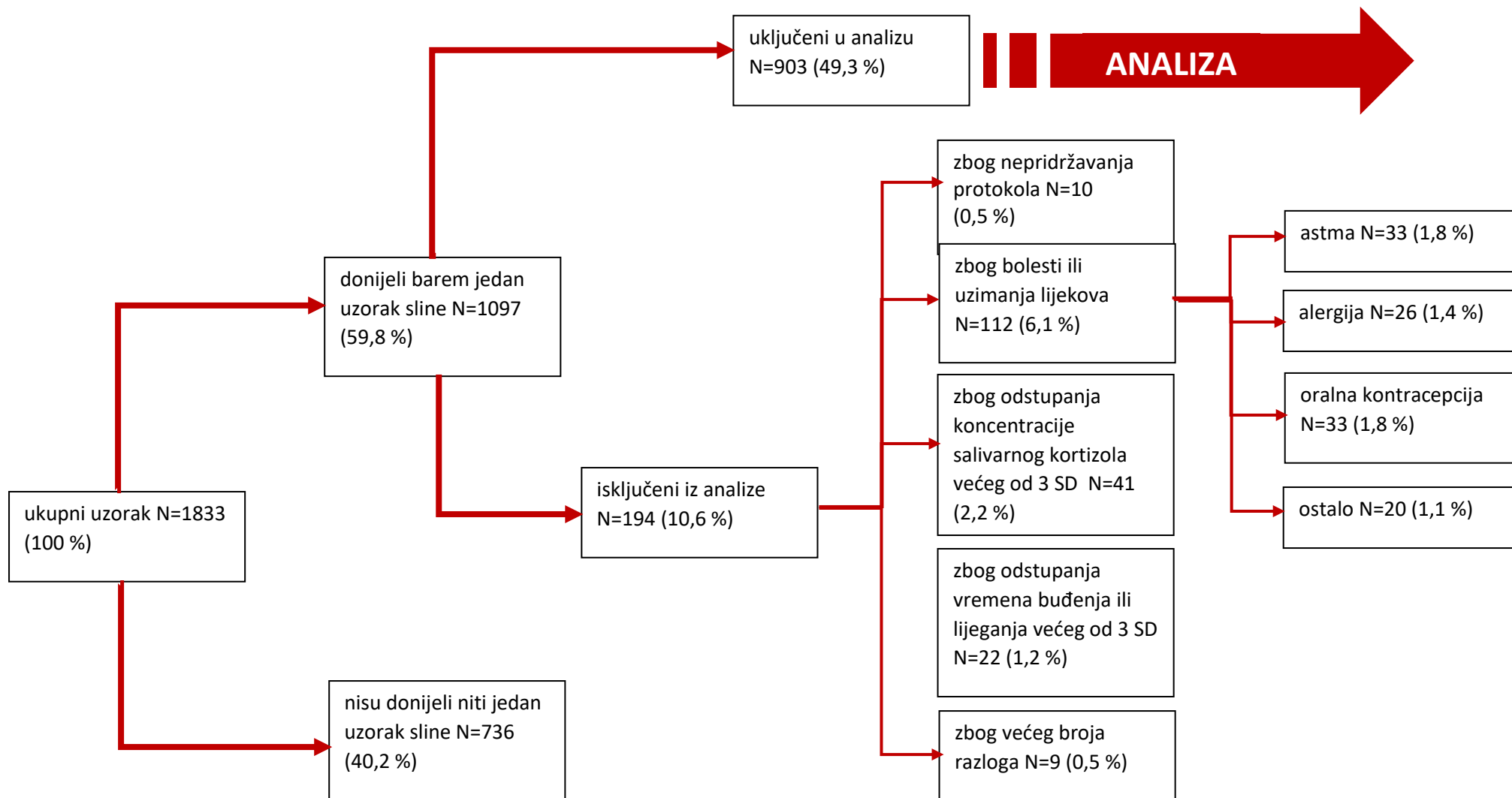
Biometrijska mjerenja obuhvaćala su antropometrijska (mjerenje visine, težine, opsega struka i bokova) i kardiovaskularna mjerenja (mjerenje krvnog tlaka, broja otkucaja srca i EKG) koja su provodili antropolozi i liječnici. Sva mjerenja obavljena su prema preporukama Nacionalnog istraživanja zdravlja i prehrane SAD-a (NHANES, 2007)<sup>141</sup>, Europskog društva za hipertenziju i Europskog društva za kardiologiju (ESH & ESC, 2007)<sup>142</sup>.

Prikupljanje upitnika, u prosječnom trajanju jednog školskog sata, podrazumijevalo je anonimno popunjavanje upitnika na papiru. Istraživači su bili prisutni u učionici cijelo vrijeme tijekom popunjavanja upitnika kako bi, u slučaju potrebe, odgovarali na dodatna pitanja i objasnili protokole. Upitnik je sadržavao demografske podatke i podatke o ponašanju u odnosu na kulturne modele u različitim domenama svakodnevnog života, zdravstvene pokazatelje (prehrana, tjelesna aktivnost, pušenje, konzumacija alkohola i droga, dijagnosticirane bolesti, lijekovi, dob menarhe, spolni odnosi i kontracepcija, samoprocjena zdravlja i zadovoljstva izgledom) te test samoprocjene stresa i strategija suočavanja sa stresom, temeljen na kognitivno-transakcijskoj teoriji stresa prema validiranom, prevedenom i kulturno prilagođenom instrumentu *Problem Questionnaire (PQ)* i *Coping Across Situations Questionnaire (CASQ)*<sup>143</sup>. Stresnost pojedinih čestica iz sedam problemskih domena procijenjena je pomoću Problemskog upitnika stresa (Seiffge-Krenke 1995). Učenici su procijenili stresnost pojedinih problema u na ljestvici od 1 (nije stresno) do 5 (izrazito stresno) u sedam problemskih domena: škola, budućnost, roditelji, vršnjaci, slobodno vrijeme, partner i ja. Učestalost pojedinih strategija suočavanja sa stresom procijenjena je pomoću Upitnika suočavanja sa stresom (Seiffge-Krenke 1995), koji obuhvaća 21 strategiju suočavanja. Učenici su za svaku problemsku domenu naznačili sve strategije suočavanja koje su koristili kada se pojavio neki problem u tom području (0 = strategija nije korištena, 1 = strategija je korištena). Prijašnja istraživanja su utvrdila postojanje triju temeljnih stilova suočavanja, aktivno suočavanje, unutarnje suočavanje i povlačenje.

Uzorci sline prikupljeni su prema protokolu za nestimulirano i pasivno davanje sline<sup>36</sup>. Zbog cirkadijalnog ritma lučenja, sudionici u istraživanju su prikupljali uzorke nestimulirane sline u jednom danu tijekom radnog tjedna po točno utvrđenom redoslijedu: neposredno po buđenju (dva uzorka, jedan za koncentracije kortizola te jedan za aktivnost alfa-amilaze), 30 do 45 minuta nakon buđenja i neposredno prije lijeganja<sup>36</sup>.

Prema smjernicama i preporukama epidemioloških istraživanja salivarnog kortizola<sup>36,144</sup> kriteriji isključenja ispitanika bili su: primjena steroidne terapije u slučajevima dijagnoza astme i alergije, primjena oralne kontracepcije, akutne bolesti na dan uzorkovanja, dijagnosticiran endokrini poremećaj, dokumentirano nepridržavanje protokola za uzimanje uzoraka sline, kao i uzorci čije su izmjerene koncentracije kortizola te vrijeme uzorkovanja prelazili tri standardne devijacije iznad prosječnih vrijednosti dobivenih u ovom istraživanju. Postupak isključenja uzoraka prikazan je na slici 3.1.





**Slika 3.1** Prikaz ispitanog uzorka učenika i kriteriji isključivanja iz analize

Budući je utjecaj primjene steroidnih lijekova na aktivnost HPAC osi i posljedično na koncentracije salivarnog kortizola poznat, isključni kriterij bio je primjena bilo koje vrste steroidnih lijekova<sup>145</sup>. Lijekovi koji se primjenjuju intranazalno, inhalacijski ili oralno mogu biti uzrok interferencija. Brojni lijekovi također smanjuju brzinu nastanka sline, uključujući diuretike, antihipertenzive, antipsihotike, antihistaminike, barbiturate, halucinogene, kanabinoide i alkohol<sup>146</sup>.

Primjena oralne kontracepcije (OC) također je bila kriterij isključivanja zbog utjecaja na CBG i promjene odnosa slobodni/vezani kortizol. Primjena OC-a stimulira sintezu CBG-a uzrokujući povećanje koncentracija ukupnog kortizola u serumu u odnosu na slobodni, salivarni kortizol. Nadalje, i međudjelovanje hipotalamičko-hipofizno-gonadalne osi (HPG os) i HPAC osi je promijenjeno u žena na terapiji OC-om<sup>147</sup>.

Vrijeme uzorkovanja, odnosno nepridržavanje protokola, bitno je zbog cirkadijalnog ritma lučenja kortizola, u kojem je najveća promjena krivulje ujutro u odnosu na ostatak dana te je stoga vrijeme buđenja i lijevanja kontrolirano kao kriterij isključenja ispitanika<sup>36</sup>.

Probir ispitanika za analize genskih polimorfizama izvršen je slučajnim odabirom nakon završenih analiza koncentracija kortizola. Ukupan broj ispitanika bio je 400, s proporcionalnom razdiobom po svakom gradu, uz podjednak broj učenika raspodijeljenih po spolu (202 učenice i 198 učenika).

Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Instituta za migracije i narodnosti (Klasa: 900-1/12-01/10; Ur.broj: 04/12-1) u kojem je bila zaposlena voditeljica projekta u vrijeme prijave projekta na natječaj Hrvatske zaklade za znanost, Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Split (Klasa: 500-03/15-01/08; Ur.broj: 2181-147-01/06/14-2) i Povjerenstvo za etičnost eksperimentalnog rada Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta u Zagrebu (Klasa: 643-03/15-01/04; Ur.broj: 251-62-03-15-41). Svi ispitanici potpisali su informirani pristanak (odvojeno za prvu i drugu fazu istraživanja) dok su maloljetni ispitanici zamoljeni da informirani pristanak supotpisu i njihovi roditelji i/ili skrbnici.

### **3.1.1 Demografska, akademska, društvena i zdravstvena obilježja učenika**

Demografska, akademska, društvena i zdravstvena obilježja učenika dobivena su iz upitnika. Demografske varijable obuhvaćale su dob, spol, vrstu srednje škole koju učenik pohađa (gimnazija ili strukovna škola) i životni standard obitelji prema samoprocjeni (nizak, prosječan i visok). Kako bi procijenili uspjeh u školi korištene su školske ocjene (od 1 do 5) i

opisne ocjene ponašanja (loše, dobro i uzorno). Za procjenu socijalnih vještina, učenici su zamoljeni da označe (s da ili ne) imaju li najboljeg prijatelja te djevojku, odnosno dečka, u trenutku izvođenja istraživanja. Učenici su također sami procjenjivali svoje zdravlje (koristeći skalu, 1 = vrlo loše do 5 = izvrsno) i prehrambene navike, temeljene na učestalosti i raznovrsnosti obroka (1 = nikad do 5 = uvijek). Također, učenici su dali informacije o učestalosti vježbanja (uopće ne vježba, rijetko do jednom tjedno, redovito - dva do tri puta tjedno, svakog dana). U konačnici, učenici su odgovarali i na pitanje o broju seksualnih partnera do izvođenja istraživanja, učestalosti konzumacije alkohola (mala - nekoliko puta godišnje ili rjeđe, umjerena - do nekoliko puta mjesečno, učestala - nekoliko puta tjedno ili češće), pušenju (nikad ili gotovo nikad, rijetko - nekoliko puta tjedno ili rjeđe, učestalo - dnevno) i zlouporabi droga (nikad ili samo jednom, nekoliko puta godišnje ili češće).

### **3.2 Uzorkovanje sline / prikupljanje uzoraka sline**

Protokol uzorkovanja sline razrađen je na način da bude najmanje opterećujući za učenike, odnosno da najmanje mijenja njihov dnevni ritam te da uzorci budu prikupljeni u naturalističkim, svakodnevnim uvjetima. Osmišljen je tako kako bi zbog jednostavnosti privukao maksimalan broj motiviranih učenika koji bi prikupili uzorke sukladno protokolu.

Uzorci sline prikupljeni su prema protokolu za nestimulirano, pasivno uzorkovanje ukupnog volumena sline, bez korištenja bilo kakvih stimulansa lučenja sline ili rolica s adsorbensom. Poznato je da stimulansi mogu mijenjati pH sline i utjecati na izvođenje imunokemijskih analiza, a adsorbenti mogu predstavljati problem za analizu uzoraka malog volumena i također mogu interferirati u analizi<sup>148</sup>. Stoga je odabran protokol kod kojeg su interferencije najmanje moguće, a to je protokol za nestimulirano, pasivno uzorkovanje<sup>144</sup>.

Prvi dan, u školi, učenici sudionici u istraživanju dobili su vrećicu s kompletom za uzorkovanje, koja se sastojala od pisanih uputa s instrukcijama, četiri obilježene polipropilenske tubice (proizvođača Nal von Minden, Moers, Njemačka) sa slamkama te kartice za bilježenje vremena davanja uzoraka, mogućih akutnih bolesti na dan uzorkovanja, terapije lijekovima, korištenja oralne kontracepcije i točnog dana ciklusa. Svaka vrećica za uzorkovanje, kao i polipropilenske tubice, bile su obilježene kodom koji se sastojao od 5 znakova konstruiranih na način da su prve dvije znamenke označavale grad i školu, dok su ostale tri znamenke dodijeljene slučajnim odabirom bez mogućnosti povezivanja sa spolom, razredom kojeg učenik pohađa ili bilo kojim drugim informacijama, koje bi mogle dovesti do

identifikacije učenika. Istraživači su prilikom podjele vrećica usmeno, pojedinačno ili u malim skupinama učenicima objasnili protokol uzorkovanja, značenje pridržavanja protokola i preciznog bilježenja vremena uzorkovanja.

Drugi dan, tijekom radnog tjedna, učenici su prikupljali uzorke sline kod kuće. Prema instrukcijama učenici su polako, lagano pomicali vilice pokretima koji su oponašali žvakanje kako bi omogućili lučenje sline u ustima te ju potom, kroz slamčicu, prikupili u polipropilensku tubicu<sup>144,148</sup>. Sukladno tzv. minimalnom protokolu (Adam EK, Kumari M, 2009) uzorci su se prikupljali po točno utvrđenom redoslijedu: dva uzorka po buđenju ( $SCC_0$  i uzorak za mjerenje aktivnosti alfa-amilaze) te po jedan uzorak 30 do 45 minuta nakon buđenja ( $SCC_{30-45}$ ) i neposredno prije lijeganja ( $SCC_{večer}$ ). Minimalni volumen uzorka u svakoj polipropilenskoj tubici bio je 1 ml. Učenici su zamoljeni da prije uzimanja jutarnjih uzoraka isperu usta vodom te se suzdrže od pranja zuba, jedenja, pijenja, pušenja i žvakanja žvakaćih guma. Kod uzorkovanja uzorka sline neposredno prije lijeganja studenti su zamoljeni da ne vježbaju, peru zube, jedu, piju, puše i žvaču žvakaće gume barem 2 sata prije uzimanja uzoraka, kako bi se izbjegle moguće ozljede usne šupljine, ali i promjene koncentracija hormona u slini i serumu. Prisutnost krvi u slini može se testirati na više načina, vizualnim očitavanjem, mjerenjem koncentracije transferina ili korištenjem testnog polja za hemoglobin na test traci za kemijsku analizu urina, a u ovom je istraživanju korišteno vizualno očitavanje.

Učenicima je savjetovano da uzorke tijekom dana pohrane u kućni hladnjak, na 2-8 °C te da ih treći dan donesu u školu. Nakon prikupljanja uzoraka u svakoj školi, pokretnim su hladnjacima dopremljeni na sabirno mjesto u svakom gradu nakon čega su bili zamrznuti na -20 °C. Zamrznuti uzorci su na suhom ledu dostavljani u Klinički bolnički centar Split na Zavod za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku, gdje su, također, do same analize bili zamrznuti na -20 °C. Vrijeme proteklo do analize bilo je od 4 do 8 tjedana.

### **3.3 Analize koncentracija kortizola i aktivnosti alfa-amilaze**

Mjerenje koncentracija kortizola provedeno je imunokemijskom metodom pomoću kita LUCIO-Medical ELISA Salivary Cortisol, u skladu s preporukama proizvođača (Nal von Minden, Moers, Njemačka). Mjerenje aktivnosti alfa-amilaze provedeno je kinetičkom metodom pomoću kita LUCIO-Medical ELISA  $\alpha$ -Amylase, prema preporukama istog proizvođača.

Nakon odmrzavanja na sobnoj temperaturi, uzorci su centrifugirani na 1500 x g, 15 minuta. Za mjerenje koncentracija kortizola standardi, kontrole i uzorci analizirani su u duplikatu. Uzeto je po 100 µl od

- a) 7 uzoraka standarda različitog raspona koncentracija (0 do 220,69 nmol/l),
- b) dva kontrolna uzorka (niže koncentracije 9,05-16,77, srednje vrijednosti 12,91 nmol/l i više koncentracije 93,79-174,34, srednje vrijednosti 134,97 nmol/l) te
- c) uzoraka sline.

Analizirani su na instrumentu Elysis Duo (Human, Wiesbaden, Njemačka) pri 450 nm, unutar 10 minuta. Koeficijent varijacije, prema podacima samog proizvođača, u seriji i između serija bio je 1,5 i 4,5 % za koncentracije 2,59 i 48,28 nmol/l i 5,8 i 7,5 % za koncentracije 112,69 i 67,00 nmol/l. Donja granica osjetljivosti bila je 1,48 nmol/l, uz 95 %-tni interval pouzdanosti. Linearnost je bila 1,48 – 212,41 nmol/l, a dinamički raspon 1,48 – 220,69 nmol/l.

Koncentracije kortizola izražavane su u nmol/l, dok su indeksi cirkadijalnog ritma dobiveni izračunom.

Odgovor kortizola na buđenje (CAR) određen je kao razlika koncentracija kortizola po buđenju i 30 do 45 minuta nakon buđenja:

$$CAR = SCC_{30-45} - SCC_0$$

Cirkadijalno smanjenje kortizola (DCD) procijenjeno je kao razlika koncentracija kortizola po buđenju i neposredno prije lijezanja, podijeljeno s proteklom vremenom, između ta dva uzorka (izraženim u satima).

$$DCD = (SCC_0 - SCC_{večer}) / \text{vrijeme između uzoraka}$$

Površina ispod krivulje ( $AUC_G$ ) određena je iz trapezoidne formule Pruessnera i suradnika<sup>56</sup>.

$$AUC_G = \frac{(m_1 + m_2) t_1 + (m_2 + m_3) t_2}{2}$$

gdje  $m_1$  -  $m_3$  označavaju koncentracije kortizola u tri vremenske točke tijekom dana, a  $t_1$  i  $t_2$  proteklo vrijeme između svakog mjerenja (izraženo u satima).

Aktivnost alfa-amilaze mjerena je kinetičkom kolorimetrijskom metodom, prema uputama proizvođača. Supstrat za reakciju bio je 2-kloro-4-nitrofenil- $\alpha$ -maltotriozid vezan na molekule polimera glukoze i kratkih lanaca p-nitrofenil-oligosaharida. Tijekom reakcije hidrolize kroz 3

minute na temperaturi 37 °C nastaje produkt 2-kloro-4-nitrofenol. Promjena intenziteta obojenja mjeri se spektrofotometrijski na 405 nm dva puta, nakon 1 minute i drugi put nakon 5 minuta od završetka inkubacije, te je proporcionalna aktivnosti alfa-amilaze u slini. Aktivnost alfa-amilaze izražena je u U/ml, a nakon provedenog mjerenja dobiva se računski iz formule:

$$\Delta A/\text{min} \times 253 = \text{U/ml}$$

gdje  $\Delta A/\text{min}$  označava razliku izmjerenih apsorbancija u petoj i prvoj minuti podijeljeno s 4 ( $\Delta A/\text{min} = (A_{5 \text{ min}} - A_{1 \text{ min}})/4$ ) dok je faktor 253 dobiven iz jednadžbe koja uključuje ukupni volumen reakcijske smjese 0,31 ml (TV), faktor razrjeđenja 100 (DF), milimolarni apsorpcijski koeficijent 2-kloro-4-nitrofenola 12,9 (MMA), volumen uzorka 0,01 ml (SV) i dužinu puta svjetla od 0,95 cm definiranu vrstom mikrotitarske pločice (LP):

$$(\Delta A/\text{min} \times \text{TV} \times \text{DF}) / (\text{MMA} \times \text{SV} \times \text{LP}) = \Delta A/\text{min} \times 253 = \text{aktivnost alfa-amilaze u U/ml}$$

Koeficijent varijacije, prema podacima samog proizvođača, u seriji i između serija bio je <1,5 % s dinamičkim rasponom od 4 - 400 U/ml. Najniža aktivnost alfa-amilaze koja se može razlikovati od nule je 2,5 U/ml (uz 95 % -tni interval pouzdanosti).

### 3.4 Izolacija DNA iz uzorka sline

Izolacija DNA dobivena iz uzorka sline (N=400) napravljena je prema uputama proizvođača, pomoću komercijalno dostupnog kita Danagen saliva kit (Barcelona, Španjolska).

U Falcon epruvete dodano je po 2 ml uzorka sline, koji su zatim centrifugirani na 4200 x g, 2 minute. Nakon uklanjanja nadtaloga, dodano je po 2 ml otopine za liziranje, 15 µl proteinaze K i 15 µl RNaze te su uzorci resuspendirani pipetom. Uzorak je potom inkubiran na 37 °C, 30 - 60 minuta, uz povremeno vorteksiranje. Nakon liziranja stanica, u epruvete je dodano 750 µl otopine za taloženje proteina. Izolacijska smjesa se vorteksirala na maksimalnoj brzini 20-30 sekundi te se centrifugirala na 6600 x g, 5 minuta. Ukoliko su se u nadtalogu nalazili plutajući fragmenti, uzorci su ponovno centrifugirani, a nakon što su se prethodno inkubirali na ledu 5 minuta. Dobiveni nadtalozci, koji su sadržavali DNA, preneseni su u nove Falcon epruvete u koje je prethodno dodano po 2 ml izopropanola. Uzorci su se izmiješali okretanjem epruveta gore-dolje, 50-ak puta te su potom centrifugirani na 5400 x g, 3 minute. Nadtalog je uklonjen, a epruvete su se osušile na čistom papiru, koji dobro upija. Za ispiranje DNA dodano je 2 ml hladnog 70 %-tnog etanola. Epruvete su potom centrifugirane na 5400 x g, 2

minute. Pažljivo je uklonjen nadtalog. Epruvete su u obrnutom položaju ostavljene da se suše na upijajućem papiru, 5-10 minuta. Nakon toga, dodano je po 500-750 µl otopine za hidrataciju DNA i uzorak je inkubiran na 55 °C, 1 sat ili preko noći, na sobnoj temperaturi, uz povremeno lagano miješanje.

Za kratkotrajnu pohranu uzorci su bili spremljeni na 2-8 °C.

### 3.5 Analize genskih polimorfizama

Dobiveni uzorak DNA (1–20 ng) koristio se za analizu polimorfizma jednog nukleotida (SNP). Istraživani polimorfizmi gena i njihova lokalizacija na kromosomu, alelne varijante i učestalost rjeđeg alela (MAF, od engl. *minor allele frequency*), prikazani su u tablici 3.1.

**Tablica 3.1** Polimorfizam pojedinačnog nukleotida (SNP), geni, lokalizacija na kromosomu, aleli i učestalost rjeđeg alela (MAF)

gen	SNP	lokalizacija na kromosomu	aleli	učestalost rjeđeg alela (MAF)
<i>NR3C2</i>	rs5522	4: 148436323	A/G	0,1175
<i>NR3C1</i>	rs6190	5: 143400772	G/A	0,0210
<i>NR3C1</i>	rs6189	5: 143278056	A/G	0,1080
<i>FKBP5</i>	rs1360780	6: 35639794	C/T	0,2994

Genotipizacija polimorfizama rs5522 gena *NR3C2*, rs6190 i rs6189 gena *NR3C1* i rs1360780 gena *FKBP5* provedena je metodom PCR u realnom vremenu, na instrumentu ABI Prism 7500 (Life Sciences, Carlsbad, SAD).

Amplifikacija je napravljena u konačnom volumenu od 10 µl reakcijske smjese, koja je sadržavala 20 ng DNA, 5 µl reakcijske smjese (engl. *Taqman Genotyping Master mix*) i 0,25 µl specifičnih početnica za svaki polimorfizam. Svi korišteni reagensi bili su od proizvođača Life Technologies (Carlsbad, SAD).

Uvjeti amplifikacije bili su sljedeći: 95 °C za fazu denaturacije, 10 minuta; 50 °C, 60 sekundi prijanjanja početnice na kalup; PCR reakcija 95 °C, 15 sekundi i 60 °C, 60 sekundi produženja lanca, ukupno 40 ciklusa.

Dobiveni rezultati analizirani su pomoću pripadajućeg programa verzija 2.3 na instrumentu ABI Prism 7500 (Life Sciences, Carlsbad, SAD).

### 3.6 Statističke analize

Statističke analize provedene su pomoću statističkog paketa SPSS/PASW verzija 20 (IBM Corp., New York, SAD).

Razlike u demografskim, akademskim, društvenim i zdravstvenim obilježjima učenika i učenika testirane su Mann-Whitney U testom. Provjere normalnosti razdiobe mjerenih koncentracija kortizola i izvedenih indeksa te aktivnosti alfa-amilaze napravljene su pomoću Kolmogorov-Smirnovljeva (KS) i Shapiro-Wilksov (SW) testa.

Zbog odstupanja od normalne raspodjele statističke razlike testirane su neparametrijskim statističkim testovima (Spearmanov koeficijent korelacije, Mann-Whitney U test za usporedbu dvije skupine podataka i Kruskal-Wallis test za usporedbu više od dvije skupine podataka). Kako bismo prepoznali skupine adolescenata s različitim obrascima buđenja i lijevanja na dan davanja uzorka slin, primijenili smo dvostupanjsku proceduru klaster analize iz programa SPSS/PASW<sup>149</sup>. U prvome koraku računao se za svaku mogućnost Bayesov informacijski kriterij (BIC) koji pruža početnu procjenu broja klastera, a u drugome se koraku početna procjena upotpunjavala pokazateljem najveće promjene u udaljenosti između dva najbliža klastera svake hijerarhijske razine. Za izradu referentnih intervala i intervala pouzdanosti korišteni su rezultati dobivenih mjerenja koncentracija kortizola i aktivnosti alfa-amilaze dok se izbor neparametrijske metode izračuna temeljio na broju uzoraka i raspodjeli podataka.

Nakon provedene genotipizacije očitani su aleli i genotipovi za pojedinačne SNP-ove. Izračunata su odstupanja od Hardy-Weinbergovog zakona ravnoteže (HWE), pomoću  $\chi^2$  testa, uz jedan stupanj slobode, za sva tri SNP-a, u cjelokupnom uzorku svih ispitanika, pomoću kalkulatora dostupnog na mrežnoj stranici <https://www.tufts.edu/><sup>150</sup>. Za analize povezanosti SNP-ova s varijablama kortizola korišten je software PLINK v1.07<sup>151</sup>, dok su za analize varijance statističke razlike testirane Mann-Whitney U testom i Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks. U svim analizama vjerojatnost od  $P < 0,05$  uzeta je kao statistički značajna.



## **4 REZULTATI**

### **4.1 Ispitanici**

#### **4.1.1 Demografska, akademska, društvena i zdravstvena obilježja učenika**

Demografski podatci i školski uspjeh učenika prikazani su u tablici 4.1, dok su osnovne demografske, akademske, društvene i zdravstvene karakteristike ukupnog uzorka učenika, kao i poduzoraka podijeljenog obzirom na spol, prikazani u tablici 4.2.

Skupina učenika koji su prikupili uzorke sline bila je po dobi podudarna skupini učenika koji nisu prikupili i vratili uzorke. Od ukupnog broja prikupljenih uzoraka sline, veći broj uzoraka prikupile su učenice u odnosu na učenike, kao i učenici gimnazija u odnosu na strukovne škole. Učenici s boljim školskim uspjehom i ponašanjem u školi također su prikupili više uzoraka sline.

Statistički značajne razlike poduzoraka podijeljenog obzirom na spol uočene su po tipu pohađane škole, školskom uspjehu i ponašanju u školi, a također i društvenom životu. Životni standard, procijenjen od strane samih učenika, također se statistički razlikuje po spolu. Svi zdravstveni pokazatelji, osim zdrave prehrane, značajno su različiti. Antropometrijske i fiziološke mjere statistički su različite, sa značajnošću  $P < 0,001$ .

**Tablica 4.1** Usporedba ispitanika koji su donijeli barem jedan uzorak sline s onima koji nisu donijeli niti jedan uzorak prema demografskim podacima i uspjehu u školi

demografski podatci	učenici koji su vratili uzorak sline (N=1097)	učenici koji nisu vratili uzorak sline (N=736)	P-vrijednost
dob (medijan i raspon godina)	19,0 (18-21)	19,0 (17-22)	P=0,073
spol (%)			<b>P&lt;0,001</b>
<i>muški</i>	49,29	50,71	
<i>ženski</i>	69,07	30,93	
tip škole (%)			<b>P&lt;0,001</b>
<i>strukovna škola</i>	52,74	47,26	
<i>gimnazija</i>	68,36	31,64	
životni standard (%)			<b>P&lt;0,001</b>
<i>nizak</i>	53,10	46,90	
<i>prosječan</i>	61,86	38,14	
<i>visok</i>	52,51	47,49	
<b>školski uspjeh</b>			
prosječna ocjena (1-5) (medijan±SD)	4,01 ±0,70	3,67 ±0,79	<b>P&lt;0,001</b>
ponašanje u školi (%)			<b>P&lt;0,001</b>
<i>loše</i>	38,64	61,36	
<i>dobro</i>	43,37	56,63	
<i>uzorno</i>	64,75	35,25	

**Tablica 4.2** Demografska, akademska, društvena i zdravstvena obilježja cjelokupnog uzorka i poduzoraka razvrstanih prema spolu

	ukupno (N=903) aritmetička sredina (± SD) /postotak		učenici (N=357) aritmetička sredina (± SD) /postotak		učenice (N=546) aritmetička sredina (± SD) /postotak		P vrijednost razlike prema spolu
<b>demografska obilježja</b>							
dob (medijan i raspon godina)	19,0	(18-21)	19,0	(18-21)	19,0	(18-21)	
životni standard (%)							<b>P=0,032</b>
<i>nizak</i>	6,99		6,46		7,34		
<i>prosječan</i>	81,80		78,93		83,67		
<i>visok</i>	11,21		14,61		8,99		
<b>obilježja škole i školski turnus</b>							
tip škole (%)							<b>P=0,021</b>
<i>strukovna škola</i>	46,51		51,26		43,40		
<i>gimnazija</i>	53,49		48,74		56,59		
turnus (%)							P=0,637
<i>prijepodnevni</i>	63,12		62,18		63,74		
<i>poslijepodnevni</i>	36,88		37,82		36,26		
<b>školsko postignuće</b>							
školski uspjeh (1-5)	4,02	±0,69	3,90	±0,74	4,10	±0,65	<b>P&lt;0,001</b>
ponašanje u školi (%)							<b>P&lt;0,001</b>
<i>loše</i>	2,89		5,32		1,29		
<i>dobro</i>	11,33		14,85		9,02		
<i>uzorno</i>	85,78		79,83		89,69		
<b>društveni život</b>							
ima najboljeg prijatelja/prijateljicu (%)	93,24		89,33		95,79		<b>P&lt;0,001</b>
ima dečka/curu (%)	36,36		31,18		39,74		<b>P=0,009</b>
<b>zdravlje i ponašanje vezano za zdravlje</b>							
samoprocjena zdravlja (1-5)	3,96	±0,76	4,11	±0,77	3,86	±0,75	<b>P&lt;0,001</b>
zdrava prehrana (1-5)	3,70	±0,83	3,72	±0,86	3,70	±0,81	P=0,738
učestalost fizičkog vježbanja (%)							<b>P&lt;0,001</b>
<i>uopće ne vježba</i>	18,96		7,02		26,74		
<i>rijetko (do jednom tjedno)</i>	26,83		20,22		31,14		
<i>redovito (dva do tri puta tjedno)</i>	34,70		41,57		30,22		
<i>svakoga dana</i>	19,51		31,18		11,90		
broj seksualnih partnera do sada	0,94	±1,36	1,38	±1,67	0,65	±1,01	<b>P&lt;0,001</b>
konzumacija alkohola (%)							<b>P&lt;0,001</b>
<i>mala (nekoliko puta godišnje ili rjeđe)</i>	63,15		49,86		71,88		
<i>umjerena (do nekoliko puta mjesečno)</i>	33,41		43,42		26,84		
<i>učestala (nekoliko puta tjedno ili češće)</i>	3,44		6,72		1,29		
pušenje (%)							<b>P&lt;0,001</b>
<i>nikad ili gotovo nikad</i>	59,60		67,51		54,41		
<i>rijetko (nekoliko puta tjedno ili rjeđe)</i>	16,09		13,45		17,83		
<i>učestalo (dnevno)</i>	24,31		19,05		27,76		
zloupotreba droga (%)							<b>P=0,007</b>
<i>nikad ili samo jednom</i>	76,28		71,55		79,37		
<i>nekoliko puta godišnje ili češće</i>	23,72		28,45		20,63		

**Tablica 4.2** Demografska, akademska, društvena i zdravstvena obilježja cjelokupnog uzorka i poduzoraka razvrstanih prema spolu (nastavak)

	ukupno (n=903) aritmetička sredina ( $\pm$ SD) /postotak		učenici (n=357) aritmetička sredina ( $\pm$ SD) /postotak		učenice (n=546) aritmetička sredina ( $\pm$ SD) /postotak		P vrijednost razlike prema spolu
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	22,46	$\pm 3,50$	23,27	$\pm 3,47$	21,93	$\pm 3,42$	<b>P&lt;0,001</b>
WHR	0,74	$\pm 0,06$	0,79	$\pm 0,04$	0,71	$\pm 0,06$	<b>P&lt;0,001</b>
WHtR	0,42	$\pm 0,05$	0,43	$\pm 0,04$	0,41	$\pm 0,05$	<b>P&lt;0,001</b>
sistolički tlak (mm hg)	118,59	$\pm 15,14$	126,14	$\pm 15,08$	113,63	$\pm 12,99$	<b>P&lt;0,001</b>
dijastolički tlak (mm hg)	73,09	$\pm 9,82$	76,45	$\pm 9,60$	70,89	$\pm 9,33$	<b>P&lt;0,001</b>

BMI - indeks tjelesne mase (engl. *body mass index*), WHR - omjer opsega struka i bokova (engl. *waist-to-hip ratio*),

WHtR - omjer opsega struka i visine (engl. *waist-height ratio*).

## 4.2 Laboratorijske analize salivarnih biljega

### 4.2.1 Koncentracije salivarnog kortizola i aktivnost alfa-amilaze

Medijani i interkvartilni rasponi (IQR) vremena buđenja, trajanja budnosti, koncentracija salivarnog kortizola, indeksa cirkadijalnog ritma lučenja i aktivnosti alfa-amilaze ukupnog uzorka, poduzoraka razvrstanih prema spolu, tipu škole i prema turnusu pohađanja nastave te rezultati Mann-Whitney U testa prikazani su u tablicama 4.3, 4.4 i 4.5.

Utvrđeno je postojanje statistički značajnih razlika između učenika i učenica u svim mjerama kortizola, osim koncentracija salivarnog kortizola neposredno prije lijeganja (tablica 4.3 i slika 4.1). Učenice su imale veće vrijednosti nego učenici, dok je aktivnost salivarne alfa-amilaze bila statistički značajno veća kod učenika.

U istraživanju nije utvrđeno postojanje statistički značajnih razlika u uzorcima učenika i učenica koji pohađaju različite tipove škola, strukovne ili gimnazije, u svim mjerama koncentracija salivarnog kortizola (tablica 4.4 i slika 4.2), kao niti aktivnosti salivarne alfa-amilaze. Statistički značajne razlike utvrđene su i u vremenu buđenja i trajanju budnosti između učenika koji pohađaju različite tipove škola kao i različite turnuse, dok se vrijeme buđenja i trajanje budnosti nije razlikovalo između učenika i učenica.

Uočene su statistički značajne razlike u uzorcima učenika i učenica koji su pohađali prijedpodneveni ili poslijepodneveni turnus za mjere kortizola  $SCC_{30-45}$  - koncentracija salivarnog kortizola 30 do 45 minuta nakon buđenja (slika 4.3), indekse cirkadijalnog ritma lučenja kortizola: CAR - odgovor kortizola na buđenje, DCD - cirkadijalno smanjenje kortizola,  $AUC_G$  - površina ispod krivulje u odnosu na nultu razinu, dok statistički značajne razlike nisu uočene za  $SCC_0$  - koncentracija salivarnog kortizola po buđenju,  $SCC_{večer}$  - koncentracija salivarnog kortizola neposredno prije lijeganja i aktivnost sAA.

**Tablica 4.3** Vrijeme buđenja, trajanje budnosti, koncentracije salivarnog kortizola, indeksi cirkadijalnog ritma lučenja i aktivnosti alfa-amilaze u ukupnom uzorku i poduzorcima razvrstanim prema spolu

	ukupan uzorak				učenici				učenice				Mann-Whitney razlike prema spolu
	N	medijan	(Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub> )	IQR	N	medijan	(Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub> )	IQR	N	medijan	(Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub> )	IQR	
vrijeme buđenja (sati)	875	7,50	(6,50-9,00)	2,50	341	7,25	(6,50-9,00)	2,50	534	7,58	(6,50-9,00)	2,50	P=0,937
trajanje budnosti (sati)	864	15,33	(14,00-16,67)	2,67	339	15,50	(14,00-16,83)	2,83	525	15,20	(14,00-16,50)	2,50	P=0,197
SCC <sub>0</sub> (nmol/l)	903	14,48	(11,03-19,12)	8,09	357	13,90	(10,69-17,61)	6,92	546	15,20	(11,09-19,70)	8,61	<b>P=0,003</b>
SCC <sub>30-45</sub> (nmol/l)	898	18,66	(14,01-24,23)	10,22	355	17,30	(12,88-21,66)	8,78	543	19,56	(14,59-26,32)	11,73	<b>P&lt;0,001</b>
SCC <sub>večer</sub> (nmol/l)	897	6,76	(4,94-8,66)	3,72	354	6,73	(4,79-9,11)	4,32	543	6,76	(5,05-8,58)	3,53	P=0,846
CAR	898	3,97	(-0,91-9,05)	9,96	355	3,03	(-1,43-7,53)	8,96	543	4,52	(-0,47-10,04)	10,51	<b>P&lt;0,001</b>
DCD	859	0,49	(0,26-0,79)	0,53	337	0,44	(0,20-0,71)	0,51	522	0,51	(0,29-0,84)	0,55	<b>P=0,001</b>
AUC <sub>G</sub>	855	199,72	(152,99-257,97)	104,98	335	191,46	(140,80-244,98)	104,18	520	206,54	(157,71-269,32)	111,61	<b>P&lt;0,001</b>
sAA (U/ml)	734	24,48	(12,90-38,87)	25,97	289	26,44	(14,68-41,02)	26,34	445	23,47	(12,18-37,03)	24,85	<b>P=0,040</b>

SCC<sub>0</sub> - koncentracija salivarnog kortizola po buđenju, SCC<sub>30-45</sub> - koncentracija salivarnog kortizola 30 do 45 minuta nakon buđenja, SCC<sub>večer</sub> - koncentracija salivarnog kortizola neposredno prije lijeganja, CAR - odgovor kortizola na buđenje, DCD - cirkadijalno smanjenje kortizola, AUC<sub>G</sub> - površina ispod krivulje u odnosu na nultu razinu, sAA - salivarna  $\alpha$ -amilaza, Q<sub>1</sub> - prvi kvartil, Q<sub>3</sub> - treći kvartil, IQR - interkvartilni raspon.

**Tablica 4.4** Vrijeme buđenja, trajanje budnosti, koncentracije salivarnog kortizola, indeksi cirkadijalnog ritma lučenja i aktivnosti salivarne  $\alpha$ -amilaze za učenike strukovnih škola i gimnazija

	strukovne škole				gimnazije				Mann-Whitney
	N	medijan	(Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub> )	IQR	N	medijan	(Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub> )	IQR	
vrijeme buđenja (sati)	400	7,00	(6,08-8,50)	2,42	475	8,17	(6,75-9,42)	2,67	<b>P&lt;0,001</b>
trajanje budnosti (sati)	397	15,50	(14,00-16,83)	2,83	467	15,17	(14,00-16,42)	2,42	<b>P=0,007</b>
SCC <sub>0</sub> (nmol/l)	420	14,08	(10,71-19,10)	8,39	483	14,79	(11,17-19,12)	7,95	P=0,664
SCC <sub>30-45</sub> (nmol/l)	419	18,21	(13,54-25,46)	11,92	479	18,92	(14,18-23,72)	9,54	P=0,585
SCC <sub>večer</sub> (nmol/l)	417	6,62	(4,97-8,62)	3,65	480	6,79	(4,94-8,71)	3,77	P=0,553
CAR	419	4,25	(-0,30-9,24)	9,54	479	3,81	(-1,32-9,02)	10,34	P=0,527
DCD	395	0,49	(0,25-0,78)	0,53	464	0,49	(0,27-0,79)	0,52	P=0,562
AUC <sub>G</sub>	393	198,11	(151,94-266,45)	114,51	462	202,52	(154,03-253,08)	99,05	P=0,944
sAA (U/ml)	323	24,48	(12,33-39,47)	27,14	411	24,48	(13,22-38,71)	25,49	P=0,820

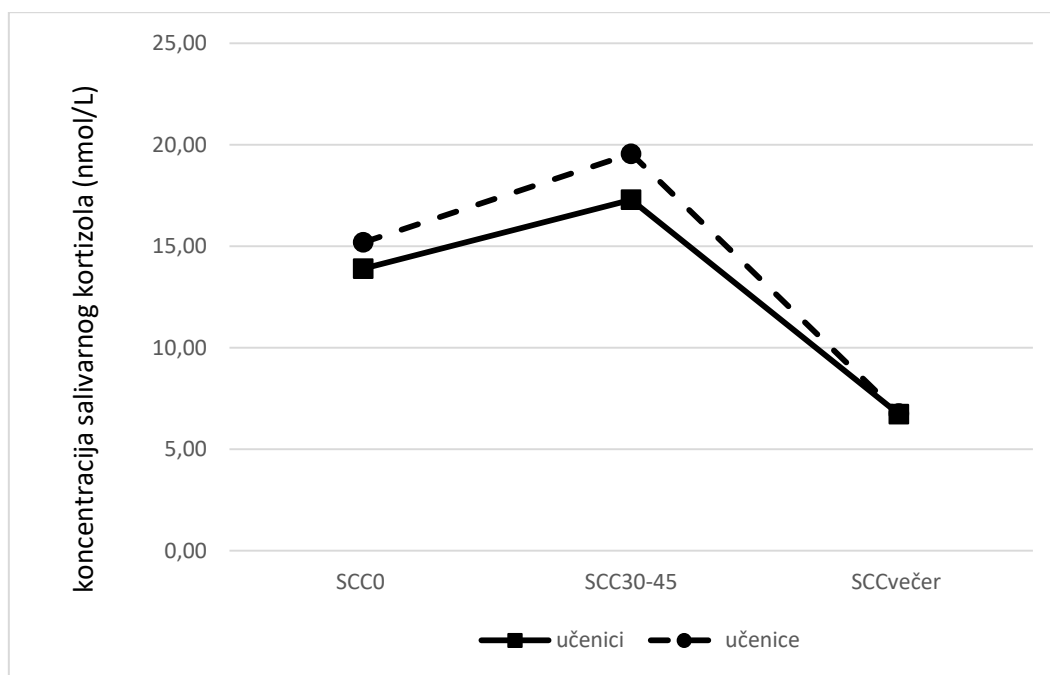
SCC<sub>0</sub> - koncentracija salivarnog kortizola po buđenju, SCC<sub>30-45</sub> - koncentracija salivarnog kortizola 30 do 45 minuta nakon buđenja, SCC<sub>večer</sub> - koncentracija salivarnog kortizola neposredno prije lijeganja, CAR - odgovor kortizola na buđenje, DCD - cirkadijalno smanjenje kortizola, AUC<sub>G</sub> - površina ispod krivulje u odnosu na nultu razinu, sAA - salivarna  $\alpha$ -amilaza, Q<sub>1</sub> - prvi kvartil, Q<sub>3</sub> - treći kvartil, IQR - interkvartilni raspon.

**Tablica 4.5** Vrijeme buđenja, trajanje budnosti, koncentracije salivarnog kortizola, indeksi cirkadijalnog ritma lučenja i aktivnosti salivarne  $\alpha$ -amilaze za učenike u prijedodnevnom i poslijepodnevnom turnusu

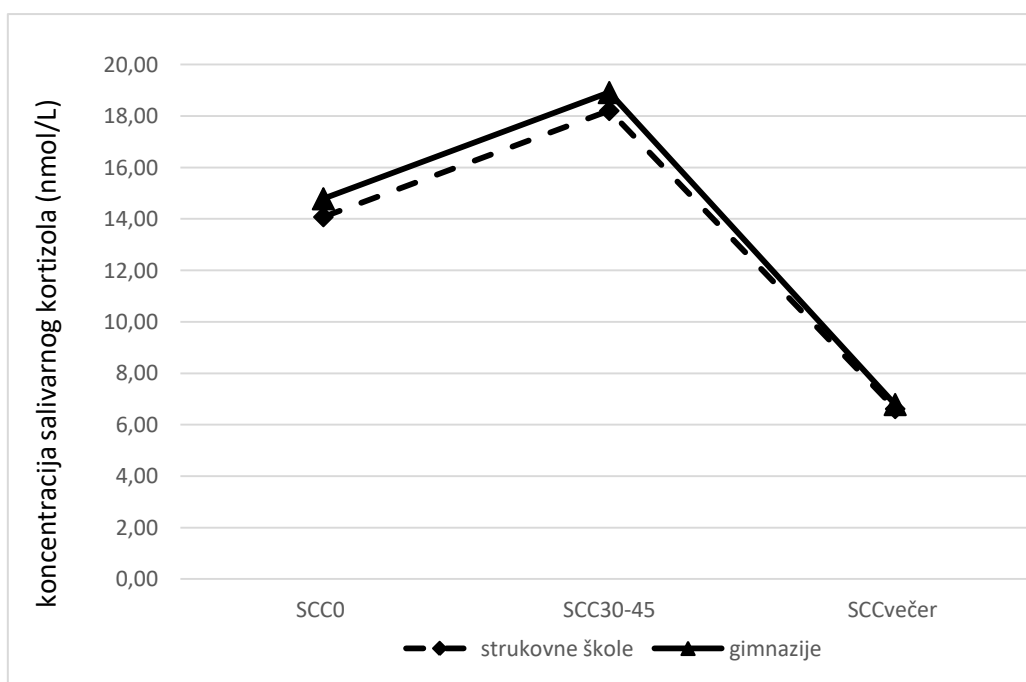
	prijepodnevni turnus				poslijepodnevni turnus				Mann-Whitney
	N	medijan	(Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub> )	IQR	N	medijan	(Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub> )	IQR	
vrijeme buđenja (sati)	550	6,69	(6,17-7,52)	1,35	325	9,00	(8,08-9,99)	1,91	<b>P&lt;0,001</b>
trajanje budnosti (sati)	540	16,17	(14,97-17,08)	2,11	324	14,17	(13,13-15,13)	2,00	<b>P&lt;0,001</b>
SCC <sub>0</sub> (nmol/l)	570	14,69	(10,80-19,21)	8,41	333	14,04	(11,23-18,66)	7,43	P=0,583
SCC <sub>30-45</sub> (nmol/l)	567	19,92	(14,73-26,34)	11,61	331	16,61	(12,44-21,43)	8,99	<b>P&lt;0,001</b>
SCC <sub>večer</sub> (nmol/l)	565	6,76	(5,03-8,86)	3,83	332	6,54	(4,80-8,57)	3,77	P=0,130
CAR	567	5,13	(0,44-10,59)	10,15	331	1,41	(-2,29-6,51)	8,80	<b>P&lt;0,001</b>
DCD	536	0,46	(0,23-0,77)	0,54	323	0,51	(0,29-0,81)	0,52	<b>P=0,025</b>
AUC <sub>G</sub>	533	221,42	(167,74-281,82)	114,08	322	165,37	(132,43-216,34)	83,91	<b>P&lt;0,001</b>
sAA (U/ml)	452	25,11	(12,93-39,47)	26,54	282	23,03	(12,87-38,07)	25,20	P=0,332

SCC<sub>0</sub> - koncentracija salivarnog kortizola po buđenju, SCC<sub>30-45</sub> - koncentracija salivarnog kortizola 30 do 45 minuta nakon buđenja, SCC<sub>večer</sub> - koncentracija salivarnog kortizola neposredno prije lijeganja, CAR - odgovor kortizola na buđenje, DCD - cirkadijalno smanjenje kortizola, AUC<sub>G</sub> - površina ispod krivulje u odnosu na nultu razinu, sAA - salivarna  $\alpha$ -amilaza, Q<sub>1</sub> - prvi kvartil, Q<sub>3</sub> - treći kvartil, IQR - interkvartilni raspon.



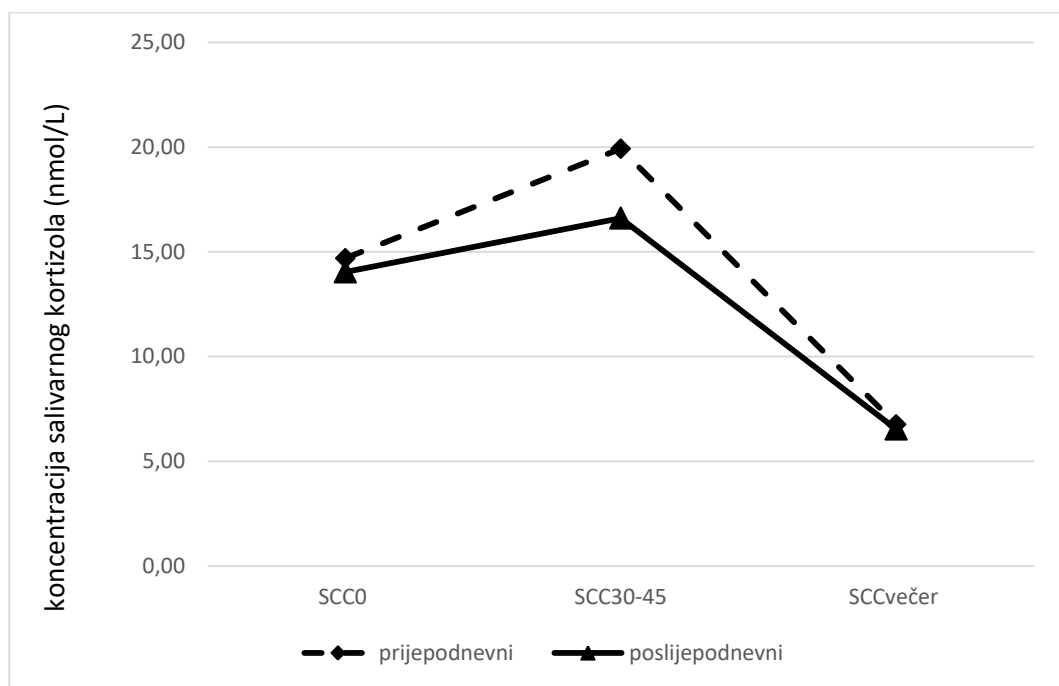


**Slika 4.1** Medijan koncentracije salivarnog kortizola u tri vremenske točke na poduzorcima razvrstanim prema spolu



**Slika 4.2** Medijan koncentracije salivarnog kortizola u tri vremenske točke prema tipu škole (gimnazije i strukovne škole)

SCC<sub>0</sub> - koncentracija salivarnog kortizola po buđenju, SCC<sub>30-45</sub> - koncentracija salivarnog kortizola 30 do 45 minuta nakon buđenja, SCC<sub>večer</sub> - koncentracija salivarnog kortizola neposredno prije lijeganja.



**Slika 4.3** Medijan koncentracije salivarnog kortizola u tri vremenske točke prema turnusu (prijednevni i popodnevni)

SCC<sub>0</sub> - koncentracija salivarnog kortizola po buđenju, SCC<sub>30-45</sub> - koncentracija salivarnog kortizola 30 do 45 minuta nakon buđenja, SCC<sub>večer</sub> - koncentracija salivarnog kortizola neposredno prije lijeganja.

#### 4.2.2 Razdioba koncentracija salivarnog kortizola, indeksa cirkadijalnog ritma lučenja i aktivnosti alfa-amilaze u poduzorku razvrstanom prema spolu

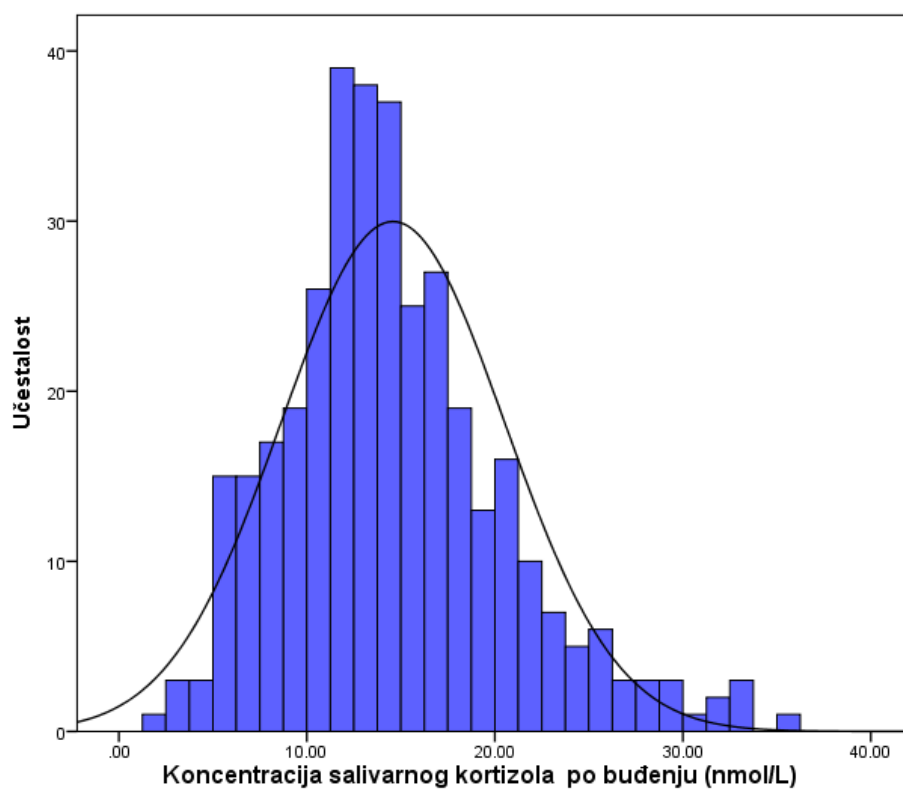
U tablici 4.6 i na slikama od 4.4 do 4.17 prikazane su razlike u razdiobi salivarnog kortizola, indeksa cirkadijalnog ritma i aktivnosti alfa-amilaze u ispitivanom uzorku učenika i učenica.

Sve mjere koncentracija salivarnog kortizola i sAA statistički odstupaju od normalne raspodjele, osim odgovora kortizola na buđenje (CAR). Asimetričnost (engl. skewness) mjera je odstupanja od simetričnosti, normalna distribucija ima vrijednost 0, dozvoljeno odstupanje je u granicama  $\pm 1$ . Zaobljenost (engl. kurtosis) mjera je spljoštenosti ili zaoštrenosti vrha distribucije, normalna distribucija ima vrijednost 0, dozvoljeno odstupanje je u granicama  $\pm 2$ .

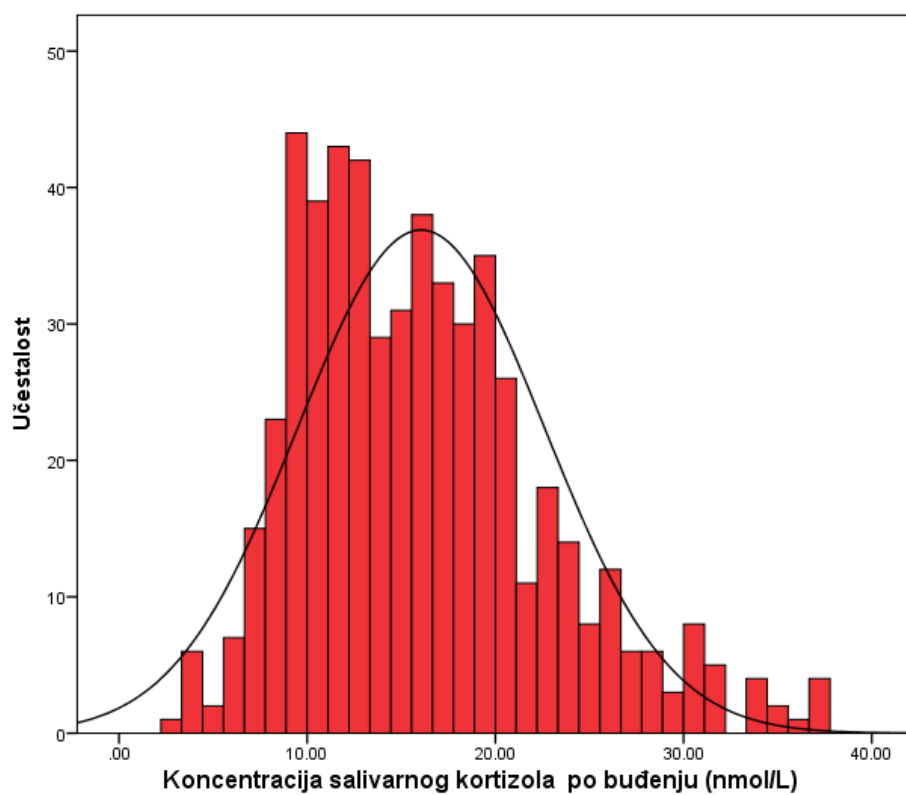
**Tablica 4.6** Statistički indikatori normalnosti razdioba koncentracija kortizola, indeksa i salivarne alfa-amilaze

	učenici					učenice				
	N	asimetričnost	zaobljenost	K-G test	S-W test	N	asimetričnost	zaobljenost	K-G test	S-W test
SCC <sub>0</sub> (nmol/l)	357	0,74	0,77	<b>P&lt;0,001</b>	<b>P&lt;0,001</b>	546	0,80	0,49	<b>P&lt;0,001</b>	<b>P&lt;0,001</b>
SCC <sub>30-45</sub> (nmol/l)	355	0,94	1,71	<b>P&lt;0,001</b>	<b>P&lt;0,001</b>	543	0,74	0,24	<b>P&lt;0,001</b>	<b>P&lt;0,001</b>
SCC <sub>večer</sub> (nmol/l)	354	1,20	1,84	<b>P&lt;0,001</b>	<b>P&lt;0,001</b>	543	1,20	2,34	<b>P&lt;0,001</b>	<b>P&lt;0,001</b>
CAR	355	0,52	1,86	<b>P=0,006</b>	<b>P&lt;0,001</b>	543	0,32	0,67	<b>P=0,018</b>	<b>P&lt;0,001</b>
DCD	337	0,55	1,13	<b>P=0,001</b>	<b>P&lt;0,001</b>	522	0,86	1,24	<b>P&lt;0,001</b>	<b>P&lt;0,001</b>
AUC <sub>G</sub>	335	1,09	2,47	<b>P=0,018</b>	<b>P&lt;0,001</b>	520	0,75	0,36	<b>P&lt;0,001</b>	<b>P&lt;0,001</b>
sAA (U/ml)	289	0,44	-0,63	<b>P&lt;0,001</b>	<b>P&lt;0,001</b>	445	0,69	-0,16	<b>P&lt;0,001</b>	<b>P&lt;0,001</b>

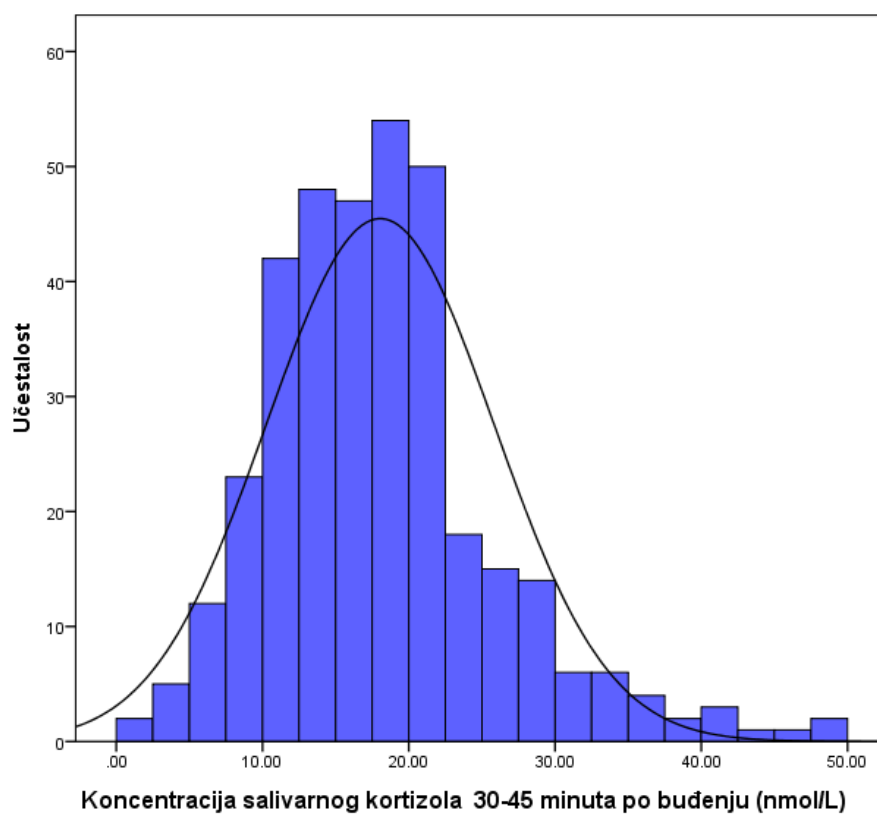
SCC<sub>0</sub> - koncentracija salivarnog kortizola po buđenju, SCC<sub>30-45</sub> - koncentracija salivarnog kortizola 30 do 45 minuta nakon buđenja, SCC<sub>večer</sub> - koncentracija salivarnog kortizola neposredno prije lijeganja, CAR - odgovor kortizola na buđenje, DCD - cirkadijalno smanjenje kortizola, AUC<sub>G</sub> - površina ispod krivulje u odnosu na nultu razinu, sAA - salivarna  $\alpha$ -amilaza, K-G = Kolmogorov – Smirnovljev test normalnosti raspodjele, S-W = Shapiro – Wilksov test normalnosti raspodjele.



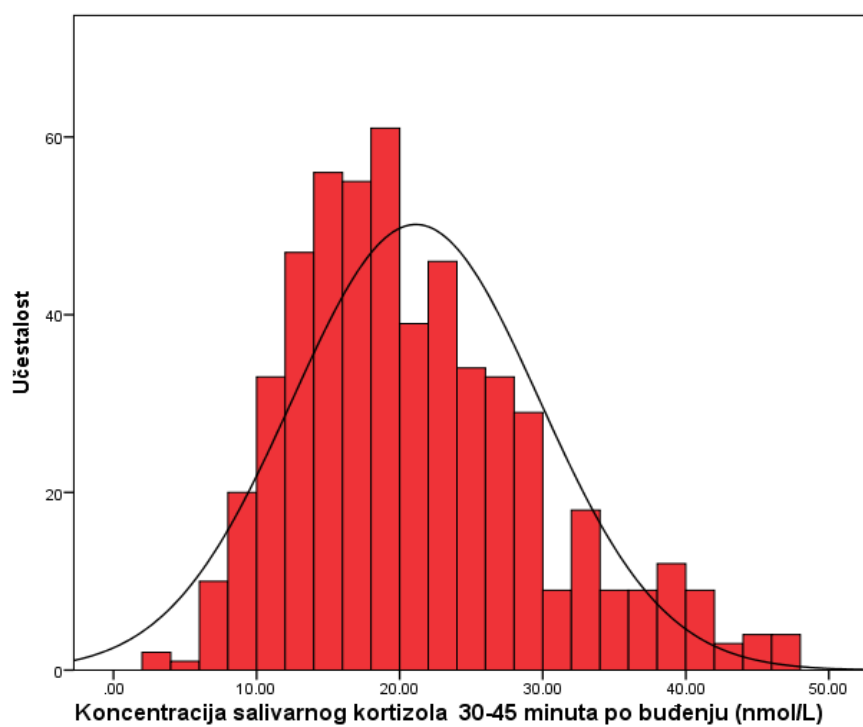
**Slika 4.4** Razdioba koncentracija salivarnog kortizola po buđenju ( $SCC_0$ ) u uzorku učenika  
( $N=357$ )



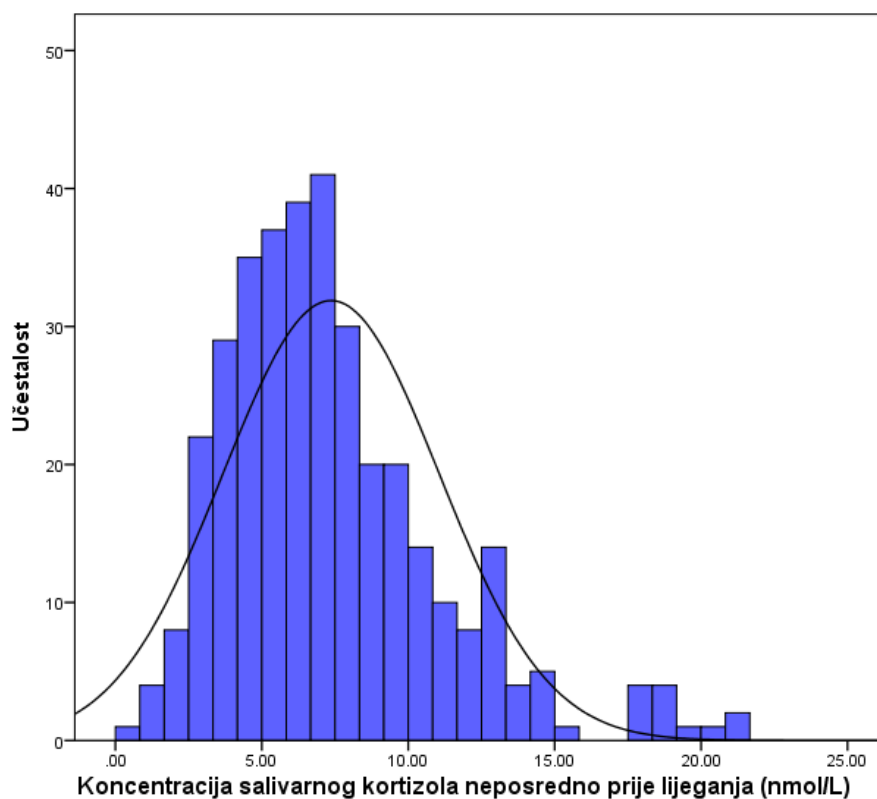
**Slika 4.5** Razdioba koncentracija salivarnog kortizola po buđenju ( $SCC_0$ ) u uzorku učenika  
( $N=546$ )



**Slika 4.6** Razdioba koncentracija salivarnog kortizola 30-45 minuta nakon buđenja ( $SCC_{30-45}$ ) u uzorku učenika (N=357)

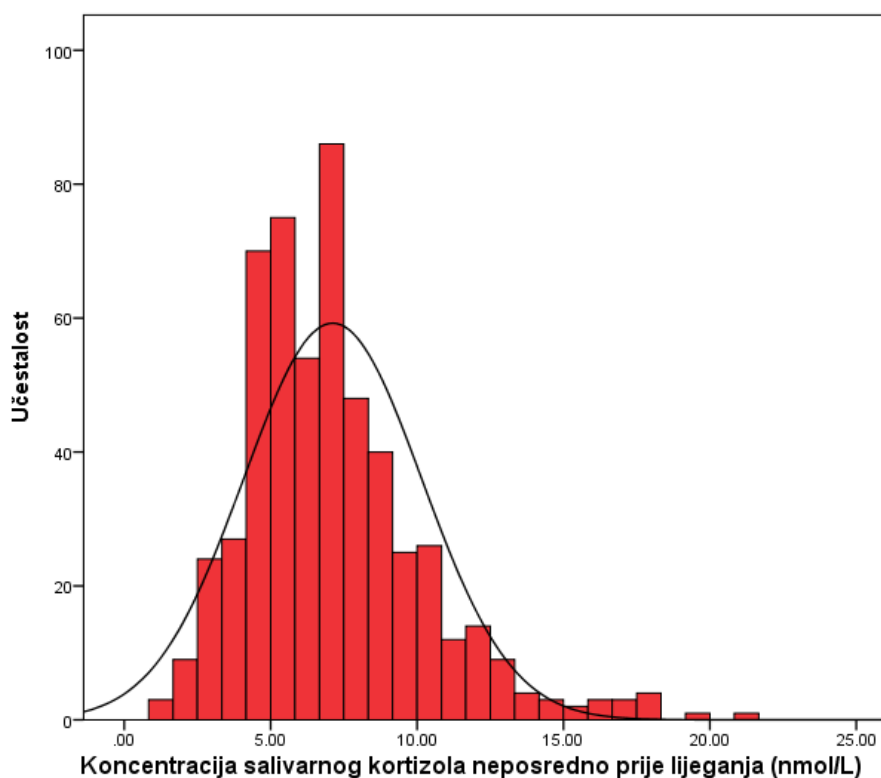


**Slika 4.7** Razdioba koncentracija salivarnog kortizola 30-45 minuta nakon buđenja ( $SCC_{30-45}$ ) u uzorku učenika (N=546)

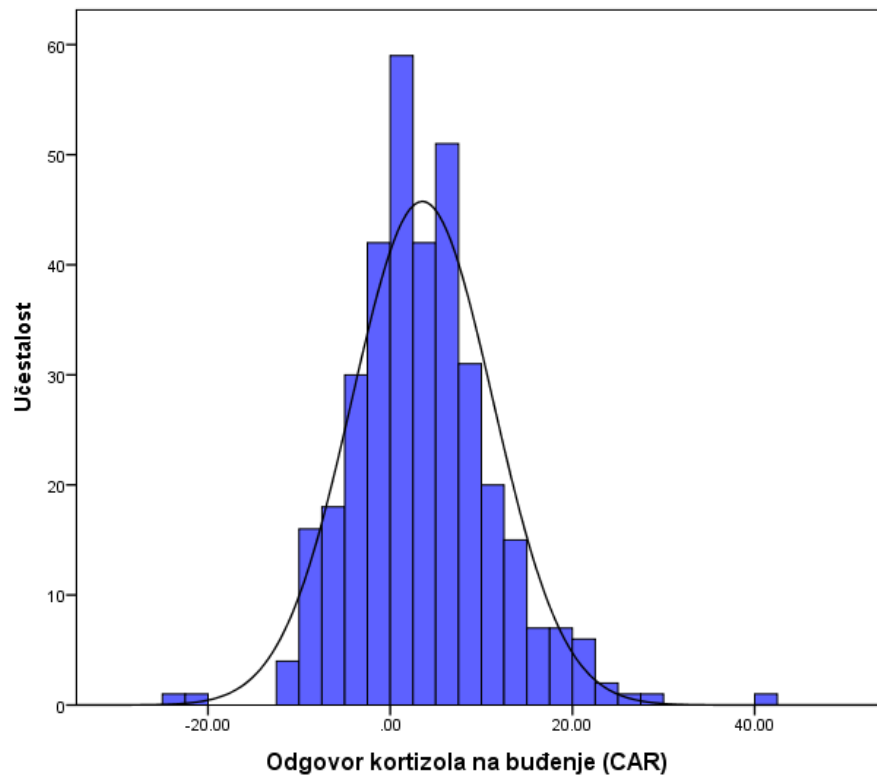


**Slika 4.8** Razdioba koncentracija salivarnog kortizola neposredno prije lijeganja ( $SCC_{večer}$ ) u uzorku učenika (N=357)

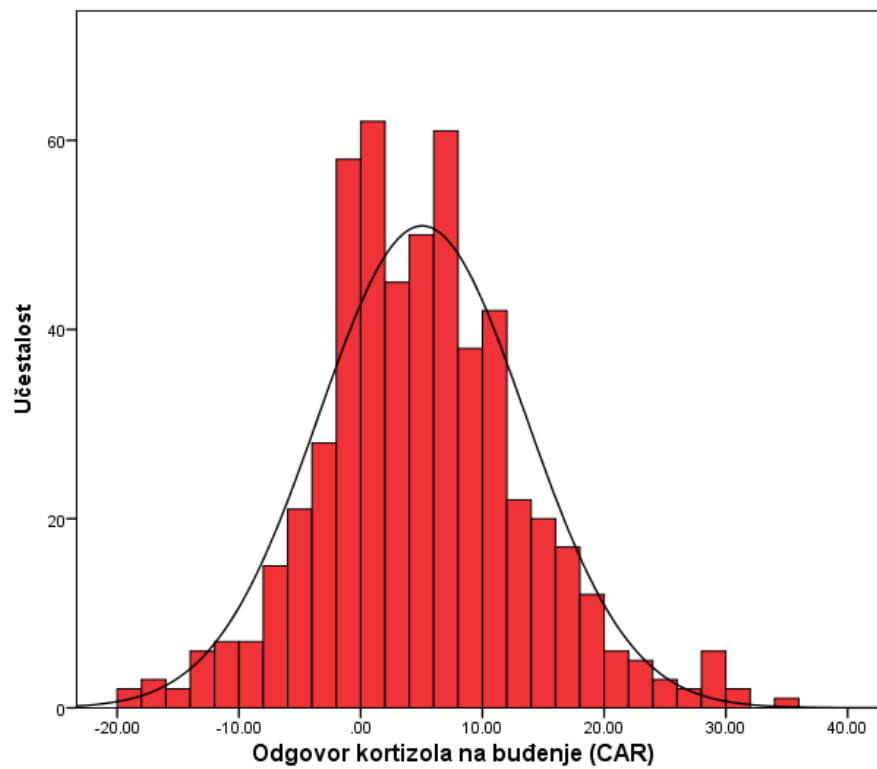
**Slika 4.9** Razdioba koncentracija salivarnog kortizola neposredno prije lijeganja ( $SCC_{večer}$ ) u



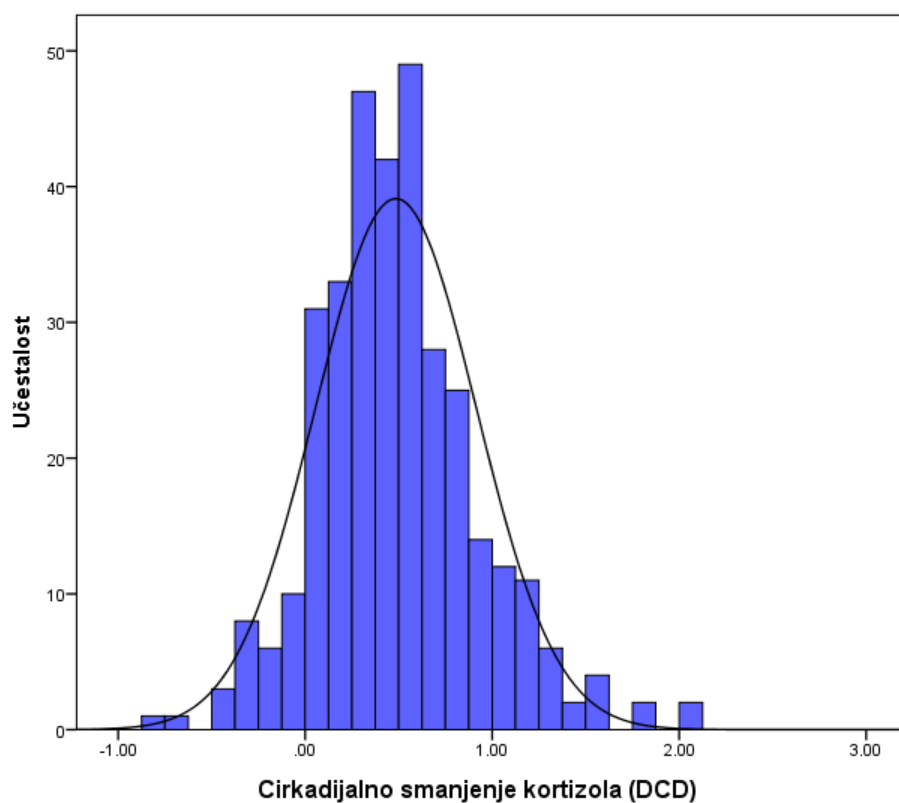
uzorku učenica (N=546)



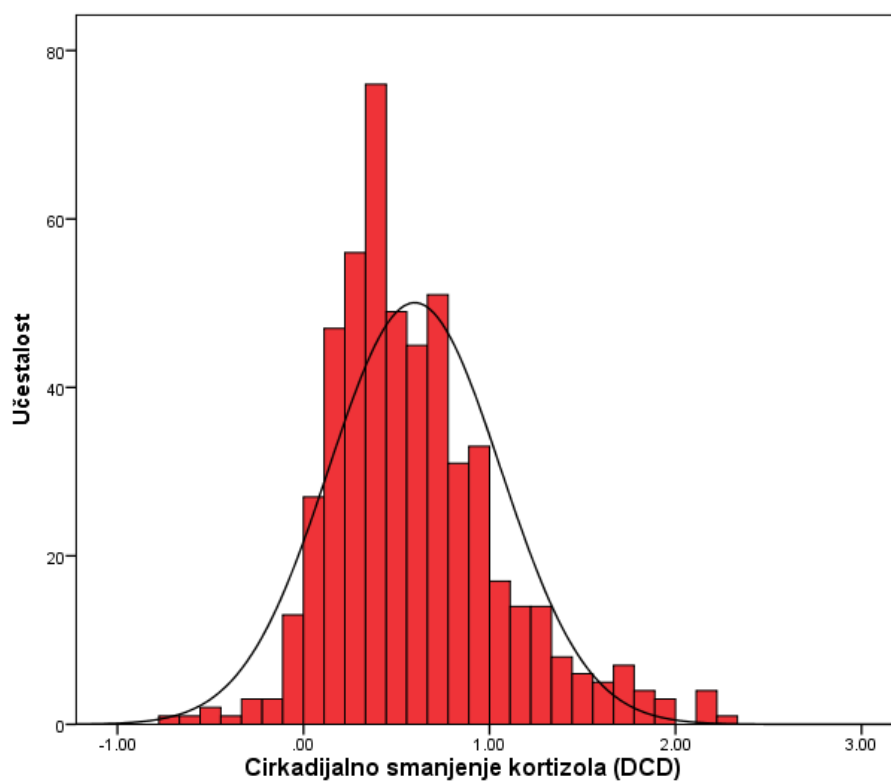
**Slika 4.10** Razdioba odgovora kortizola na buđenje (CAR) u uzorku učenika (N=357)



**Slika 4.11** Razdioba odgovora kortizola na buđenje (CAR) u uzorku učenica (N=546)

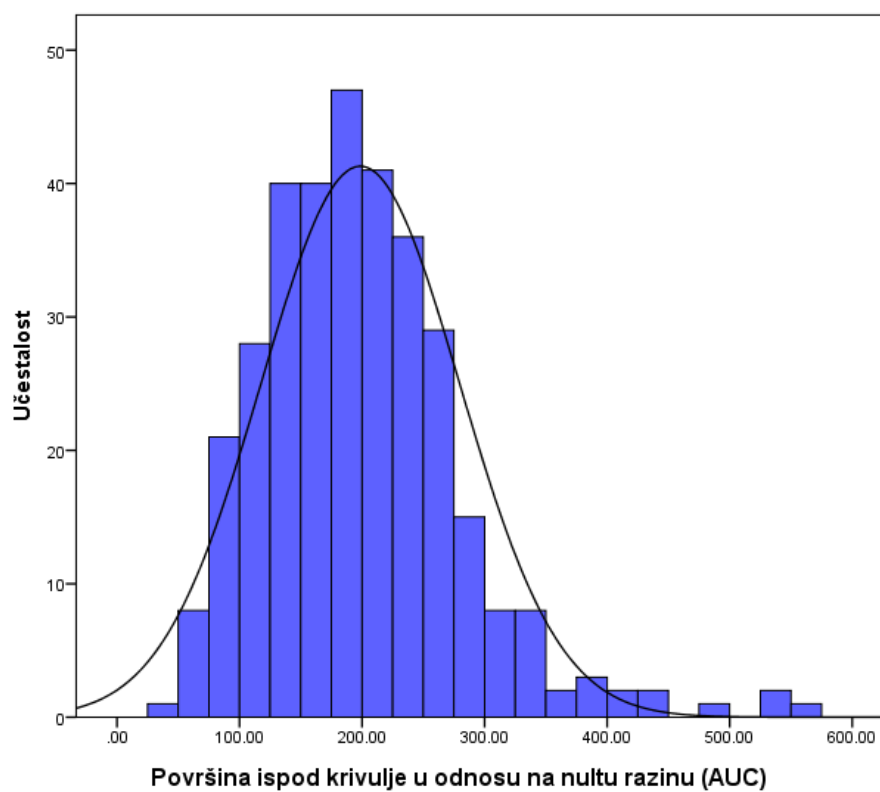


**Slika 4.12** Razdioba cirkadijalnog smanjenja kortizola (DCD) u uzorku učenika (N=357)

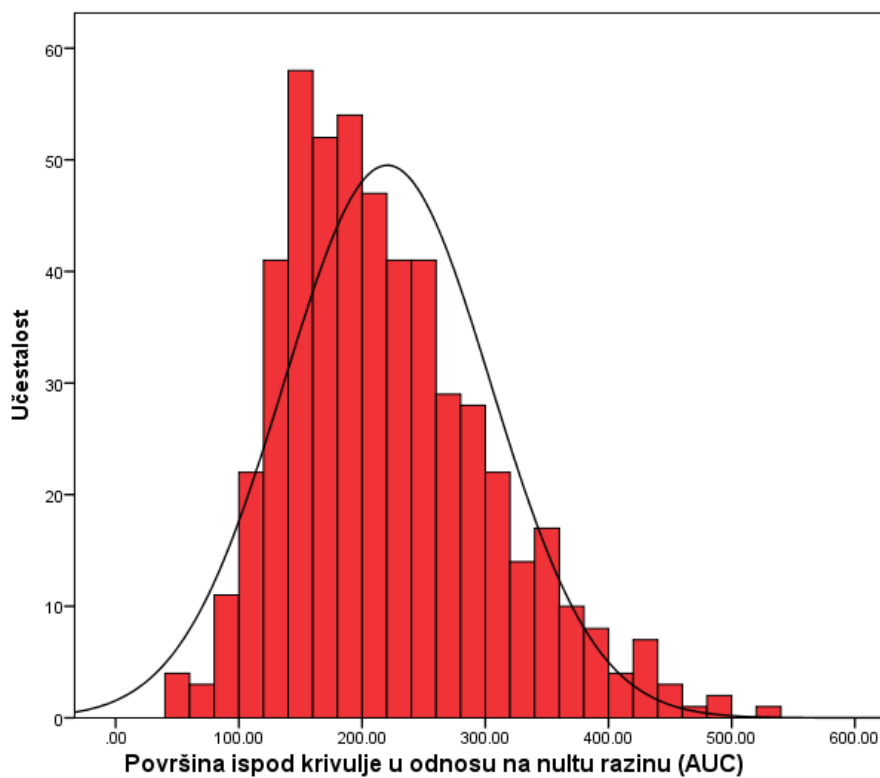


**Slika 4.13** Razdioba cirkadijalnog smanjenja kortizola (DCD) u uzorku učenica (N=546)

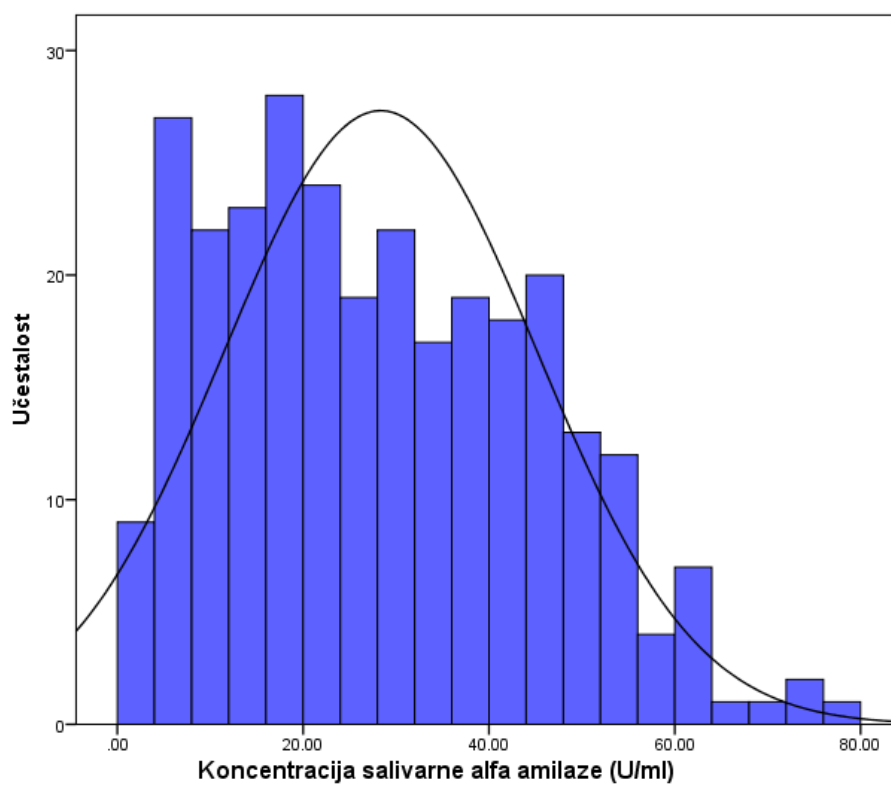




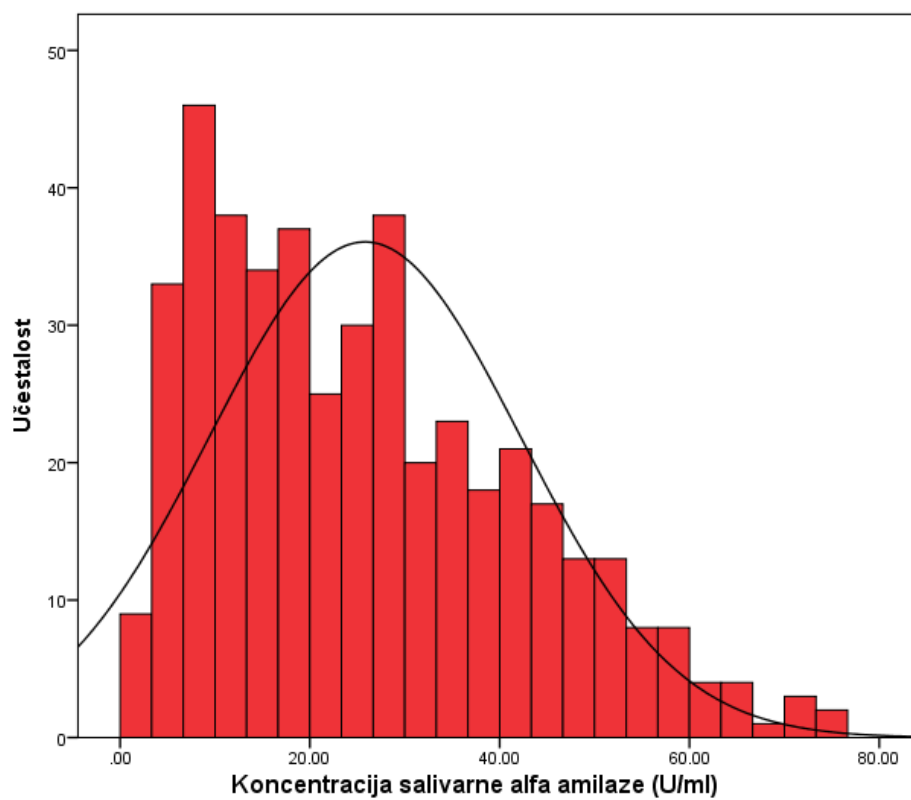
**Slika 4.14** Razdioba površina ispod krivulje ( $AUC_G$ ) u uzorku učenika (N=357)



**Slika 4.15** Razdioba površina ispod krivulje ( $AUC_G$ ) u uzorku učenica (N=546)



**Slika 4.16** Razdioba aktivnosti salivarne  $\alpha$ -amilaze (sAA) po buđenju u uzorku učenika (N=357)



**Slika 4.17** Razdioba koncentracija salivarne  $\alpha$ -amilaze (sAA) po buđenju u uzorku učenika (N=546)

### 4.2.3 Korelacijske analize koncentracija salivarnog kortizola, indeksa cirkadijalnog ritma lučenja i aktivnosti alfa-amilaze u ukupnom uzorku

Korelacijske analize koncentracija salivarnog kortizola, indeksa cirkadijalnog ritma lučenja i aktivnosti alfa-amilaze na ukupnom uzorku prikazane su u tablici 4.7.

Korelacijske analize pokazale su statistički značajnu povezanost većine analiziranih salivarnih varijabli. Rezultati analiza koeficijenata korelacija ukazuju na umjerenu do vrlo dobru povezanost između koncentracija salivarnog kortizola po buđenju ( $SCC_0$ ), koncentracija salivarnog kortizola 30 do 45 minuta nakon buđenja ( $SCC_{30-45}$ ), kao i indeksa cirkadijalnog ritma lučenja (DCD i  $AUC_G$ ), a slabiju povezanost s odgovorom kortizola na buđenje (CAR) i koncentracijom salivarnog kortizola neposredno prije lijeganja ( $SCC_{večer}$ ).  $SCC_{30-45}$  pokazivao je dobru povezanost sa svim mjerama salivarnog kortizola, dok sa aktivnosti salivarnog  $\alpha$ -amilaze nema statistički značajne povezanosti. Korelacija  $SCC_{večer}$  s CAR nije potvrđena kao niti s aktivnosti salivarnog  $\alpha$ -amilaze, dok je povezanost uočena s DCD i  $AUC_G$ . Umjerena korelacija pronađena je između CAR i DCD te CAR i  $AUC_G$ . Nije dokazana povezanost aktivnosti salivarnog  $\alpha$ -amilaze s koncentracijama salivarnog kortizola u različitim vremenskim točkama, kao ni s indeksima cirkadijalnog ritma lučenja kortizola.

**Tablica 4.7** Spearmanovi koeficijenti korelacije između koncentracija salivarnog kortizola u različitim vremenskim točkama, indeksa cirkadijalnog ritma lučenja i salivarnog  $\alpha$ -amilaze (N=903)

	$SCC_0$	$SCC_{30-45}$	$SCC_{večer}$	CAR	DCD	$AUC_G$	sAA
$SCC_0$	-	<b>0,407**</b>	<b>0,166**</b>	<b>-0,351**</b>	<b>0,859**</b>	<b>0,378**</b>	-0,016
$SCC_{30-45}$		-	<b>0,161**</b>	<b>0,713**</b>	<b>0,255**</b>	<b>0,911**</b>	-0,040
$SCC_{večer}$			-	0,036	<b>0,326**</b>	<b>0,442**</b>	-0,006
CAR				-	<b>0,399**</b>	<b>0,646**</b>	-0,028
DCD					-	0,058	-0,011
$AUC_G$						-	-0,054
sAA							-

\*\* P<0,01

$SCC_0$  - koncentracija salivarnog kortizola po buđenju,  $SCC_{30-45}$  - koncentracija salivarnog kortizola 30 do 45 minuta nakon buđenja,  $SCC_{večer}$  - koncentracija salivarnog kortizola neposredno prije lijeganja, CAR - odgovor kortizola na buđenje, DCD - cirkadijalno smanjenje kortizola,  $AUC_G$  - površina ispod krivulje u odnosu na nultu razinu, sAA - salivarna  $\alpha$ -amilaza.

### 4.3 Klusterske analize

Za klustersku analizu primijenjena je dvostupanjska procedura iz programa SPSS/PASW kako bi se prepoznale skupine učenika s različitim obrascima buđenja i lijeganja na dan davanja uzorka sline. Ispitanici su razvrstavani prema vremenu buđenja i lijeganja. Korištena procedura omogućava određivanje klastera automatski, zbog čega je lišena subjektivnosti i proizvoljnosti. U prvome koraku računa se za svako rješenje Bayesov informacijski kriterij (BIC), koji pruža početnu procjenu broja klastera, a u drugome se početna procjena upotpunjava pokazateljem najveće promjene u udaljenosti između dva najbliža klastera svake hijerarhijske razine (tablica 4.8)

**Tablica 4.8** Rezultati klusterske analize dvostupanjskom procedurom

broj klastera	Bayesov informacijski kriterij (BIC)	BIC promjena	omjer BIC promjene	omjer mjera udaljenosti
1	1251,622			
2	906,722	-344,900	1,000	2,060
3	753,275	-153,447	0,445	1,247
4	635,571	-117,703	0,341	1,457
5	563,294	-72,278	0,210	2,222
6	545,684	-17,610	0,051	1,161
7	534,293	-11,391	0,033	1,016
8	523,495	-10,798	0,031	1,403
9	523,596	0,102	0,000	1,001
10	523,712	0,116	0,000	1,008
11	524,040	0,328	-0,001	1,153
12	527,930	3,890	-0,011	2,007
13	543,482	15,552	-0,045	1,028
14	559,351	15,869	-0,046	1,074
15	575,994	16,643	-0,048	1,054

#### 4.3.1 Koncentracije salivarnog kortizola, indeksi cirkadijalnog ritma lučenja i aktivnosti alfa-amilaze na poduzorku klastera

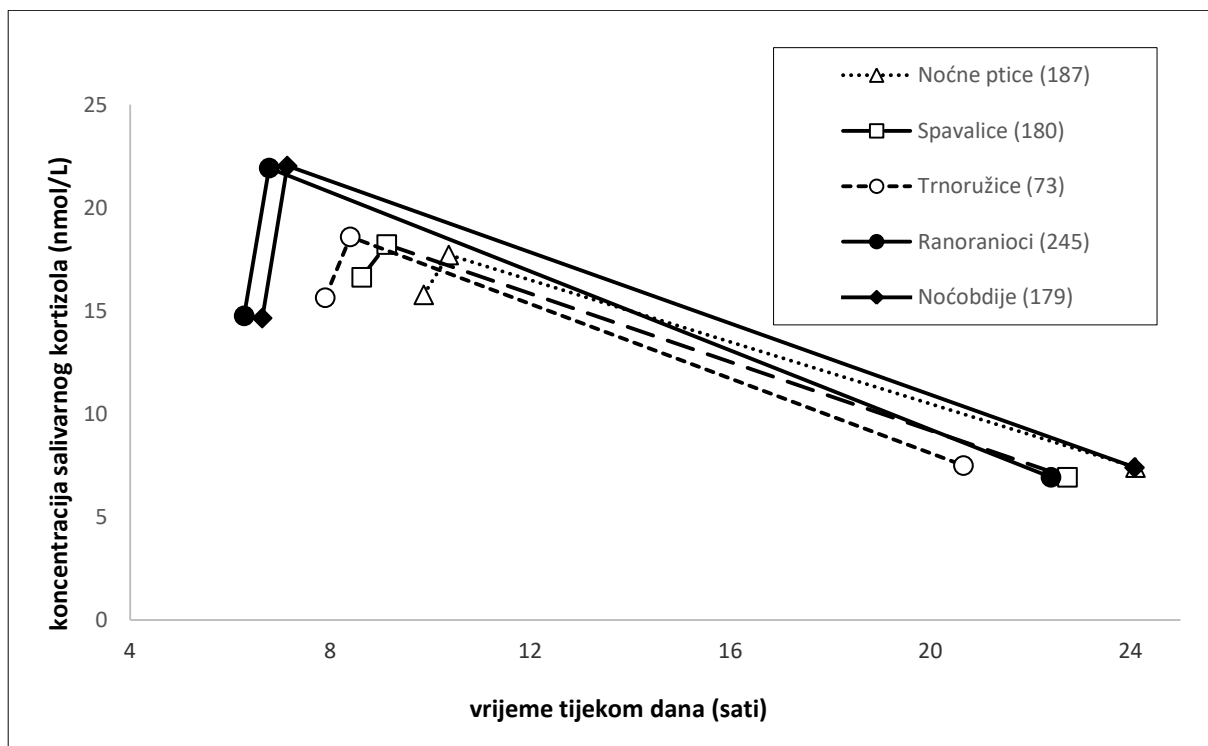
Klusterskom analizom na ukupnom uzorku učenika s različitim obrascima buđenja i lijeganja na dan davanja uzorka sline definirano je pet klastera (tablica 4.9 i slika 4.18) i to: *noćne ptice* (najkasnije buđenje i kasno lijeganje), *spavalice* (kasno buđenje i rano lijeganje), *trnoružice* (najranije lijeganje), *ranoranioci* (najranije buđenje) i *noćobdije* (rano buđenje i kasno lijeganje). Tablica 4.9 pokazuje medijane i IQR vremena buđenja, trajanja budnosti, koncentracija salivarnog kortizola i indeksa cirkadijalnog ritma lučenja kortizola za pet klastera, kao i razlike među klasterima (Kruskal-Wallis test).

Ranije buđenje karakteriziralo je klaster *ranoranilaca* (6,33 sata) i *noćobdija* (6,68 sati) dok je kasno buđenje bilo povezano s klasterima *trnoružica* (7,75 sati), *spavalica* (8,50 sati) i *noćnih ptica* (9,87 sati). Duže trajanje budnosti bilo je karakteristično za *ranoranioce* (16,08 sati) i *noćobdije* (17,33 sati), a kraće trajanje budnosti za *trnoružice* (13,00 sati), *noćne ptice* (14,13 sati) i *spavalice* (14,15 sati). Između svih klastera dokazane su statistički značajne razlike u svim mjerama salivarnog kortizola, osim u koncentraciji salivarnog kortizola neposredno prije lijeganja. Aktivnost salivarne alfa-amilaze nije se statistički razlikovala među klasterima.

**Tablica 4.9** Vrijeme buđenja, trajanje budnosti, koncentracije salivarnog kortizola i aktivnost salivarne  $\alpha$ -amilaze za klastere različitog ritma spavanja i budnosti

	<i>noćne ptice</i> (N = 187)		<i>spavalice</i> (N = 180)		<i>trnoružice</i> (N = 73)		<i>ranoranioci</i> (N = 245)		<i>noćobdije</i> (N = 179)		Kruskal-Wallis test	
	medijan	IQR	medijan	IQR	medijan	IQR	medijan	IQR	medijan	IQR	X <sup>2</sup>	P
vrijeme buđenja (sati)	9,87	1,00	8,50	0,92	7,75	2,13	6,33	0,75	6,68	0,67	646,76	<b>P&lt;0,001</b>
trajanje budnosti (sati)	14,13	1,67	14,15	1,53	13,00	2,17	16,08	1,25	17,33	1,25	609,60	<b>P&lt;0,001</b>
SCC <sub>0</sub> (nmol/l)	14,76	7,82	15,93	7,86	14,92	9,78	13,46	8,47	14,10	7,97	15,04	<b>P=0,005</b>
SCC <sub>30-45</sub> (nmol/l)	16,87	8,99	16,94	9,52	16,61	11,26	20,52	11,05	20,63	10,95	47,51	<b>P&lt;0,001</b>
SCC <sub>večer</sub> (nmol/l)	6,94	3,46	6,50	3,50	6,98	4,29	6,36	3,54	6,81	3,72	6,24	P=0,182
CAR	1,13	8,73	0,61	10,32	1,43	10,54	6,43	9,33	6,73	9,10	105,08	<b>P&lt;0,001</b>
DCD	0,53	0,52	0,62	0,53	0,55	0,73	0,42	0,47	0,38	0,50	44,08	<b>P&lt;0,001</b>
AUC <sub>G</sub>	180,58	85,09	167,23	86,00	160,68	93,85	222,93	119,09	242,21	103,59	143,89	<b>P&lt;0,001</b>
sAA (U/ml)	24,45	24,37	24,67	23,91	27,83	26,06	23,25	26,62	22,52	26,63	4,38	P=0,357

SCC<sub>0</sub> - koncentracija salivarnog kortizola po buđenju, SCC<sub>30-45</sub> - koncentracija salivarnog kortizola 30 do 45 minuta nakon buđenja, SCC<sub>večer</sub> - koncentracija salivarnog kortizola neposredno prije lijeganja, CAR - odgovor kortizola na buđenje, DCD - cirkadijalno smanjenje kortizola, AUC<sub>G</sub> - površina ispod krivulje u odnosu na nultu razinu, sAA - salivarna  $\alpha$ -amilaza.



**Slika 4.18** Medijan koncentracija kortizola u tri vremenske točke ( $SCC_0$ ,  $SCC_{30-45}$  i  $SCC_{večer}$ ) za različite klastere prema obrascima buđenja i lijeganja



#### **4.3.2 Indeks odgovora kortizola na buđenje (CAR) u cjelokupnom uzorku, poduzorcima razvrstanim prema spolu, turnusu i klasteru**

U tablici 4.10 prikazan je indeks odgovora kortizola na buđenje (CAR) u ukupnom uzorku i poduzorcima te u pet klastera različitog ritma buđenja i trajanja budnosti. Kao kriterij za odgovor kortizola uzeto je povećanje koncentracije kortizola po buđenju od 2,5 nmol/l<sup>152</sup>.

Indeks odgovora kortizola na buđenje  $> 2,5$  nmol/l imao je 56,1 % učenika iz cjelokupnog uzorka dok 43,9 % učenika nije imalo odgovor kortizola na buđenje. U poduzorcima razvrstanim prema spolu fiziološki odgovor nakon buđenja imalo je više učenica (58,9 %) dok je sukladno tomu odgovor kortizola na buđenje, koji je bio  $< 2,5$  nmol/l, imalo više učenika (48,2 %). Učenici koji su pohađali različite turnuse, također, statistički značajno se razlikuju u odgovoru kortizola na buđenje. Veći postotak učenika koji pohađaju prijedpodnevni turnus imao je zadovoljavajući odgovor kortizola na buđenje (63,0 %) dok su učenici koji pohađaju poslijepodnevni turnus većinom imali odgovor kortizola na buđenje  $< 2,5$  nmol/l (55,6 %). Analizom poduzoraka klastera utvrdilo se da se odgovor kortizola na buđenje statistički značajno razlikuje. Učenici klastera *ranoranioca* (najranije buđenje) i *noćobdija* (rano buđenje i kasno lijevanje) u najvećem postotku su imali zadovoljavajući odgovor kortizola na buđenje (70,4 % i 76,3 %, pojedinačno). Odgovor kortizola na buđenje  $< 2,5$  nmol/l imali su učenici u odnosu na učenice, te učenici koji pohađaju poslijepodnevni turnus kao i učenici koji pripadaju klasterima *noćnih ptica*, *spavalica* i *trnoružica*.

**Tablica 4.10** Prikaz odgovora kortizola na buđenje (CAR) u cjelokupnom uzorku, poduzorcima razvrstanim po spolu, turnusu nastave i pet klastera prema obrascima buđenja i lijeganja

	ukupno	učenici	učenice	prijep. turnus	poslijep. turnus	<i>noćne ptice</i>	<i>spavalice</i>	<i>trnoružice</i>	<i>ranoranioci</i>	<i>noćobdije</i>
CAR < 2,5 nmol/l	43,9%	48,2%	41,1%	37,0%	55,6%	58,3%	59,8%	56,2%	29,6%	23,7%
CAR > 2,5 nmol/l	56,1%	51,8%	58,9%	63,0%	44,4%	41,7%	40,2%	43,8%	70,4%	76,3%
		$\chi^2=4,40$ (P=0,036)		$\chi^2=29,21$ (P<0,001)		$\chi^2=87,99$ (P<0,001)				

CAR = odgovor kortizola na buđenje,  $\chi^2$ =hi kvadrat

#### **4.4 Referentni intervali koncentracija salivarnog kortizola, indeksa cirkadijalnog ritma lučenja i aktivnosti alfa-amilaze poduzoraka podijeljenog prema spolu**

U tablici 4.11 prikazani su izračuni referentnih intervala i intervala pouzdanosti koncentracija salivarnog kortizola i indeksa cirkadijalnog ritma njegova lučenja te aktivnosti salivarne alfa-amilaze u slini.

Izbor metode za izračun referentnog intervala temeljio se na broju uzoraka i raspodjeli podataka. *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* koji razvija i implementira kliničko-laboratorijske standarde i smjernice, 2010. godine objavio je dokument EP28-A3c, smjernice za izradu referentnih intervala (Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline-Third Edition; Volume 28; Number 30). Navedene smjernice kao preporučenu metodu za izračun referentnog intervala navode neparametrijsku metodu na kojoj su se i temeljili izračuni referentnih intervala iz rezultata dobivenih istraživanjem.

**Tablica 4.11** Referentni intervali i intervali pouzdanosti koncentracija salivarnog kortizola u tri mjerene vremenske točke, indeksa salivarnog kortizola i aktivnosti salivarne  $\alpha$ -amilaze u uzorku učenika i učenica starosti (dob 17-22, medijan 19) iz četiri najveća hrvatska grada (Zagreba, Splita, Rijeke i Osijeka)

	učenici	učenice
<b>SCC<sub>0</sub> (nmol/l)</b> raspon (95%) interval pouzdanosti (CI 90%) N	5,26 - 29,34 (3,64 - 5,52) - (26,70 - 33,35) 357	5,99 - 31,98 (5,38 - 7,09) - (30,77 - 34,32) 546
<b>SCC<sub>30-45</sub> (nmol/l)</b> raspon (95%) interval pouzdanosti (CI 90%) N	5,31 - 37,86 (3,50 - 6,57) - (34,57 - 44,50) 355	8,01 - 41,13 (7,06 - 8,89) - (39,94 - 44,08) 543
<b>SCC<sub>večer</sub> (nmol/l)</b> raspon (95%) interval pouzdanosti (CI 90%) N	2,26 - 18,32 (1,46 - 2,68) - (14,84 - 20,00) 354	2,54 - 15,61 (2,25 - 2,69) - (13,38 - 16,99) 543
<b>CAR</b> raspon (95%) interval pouzdanosti (CI 90%) N	-9,67 - 21,11 (-11,89 - -8,39) - (18,32 - 24,72) 355	-11,68 - 24,39 (-13,51 - -9,85) - (21,69 - 28,65) 543
<b>DCD</b> raspon (95%) interval pouzdanosti (CI 90%) N	-0,29 - 1,50 (-0,43 - -0,24) - (1,28 - 1,81) 337	-0,10 - 1,77 (-0,25 - -0,03) - (1,69 - 1,91) 522
<b>AUC<sub>G</sub></b> raspon (95%) interval pouzdanosti (CI 90%) N	71,22 - 410,99 (64,32 - 80,55) - (343,37 - 495,58) 335	94,93 - 422,81 (85,41 - 101,58) - (395,69 - 437,80) 520
<b>sAA (U/ml)</b> raspon (95%) interval pouzdanosti (CI 90%) N	3,33 - 62,65 (3,16 - 4,81) - (58,63 - 72,17) 289	3,50 - 62,95 (3,29 - 4,12) - (59,16 - 65,78) 445

## **4.5 Procjena stresa i suočavanja**

### **4.5.1 Analiza stresa po domenama života u cjelokupnom uzorku i poduzorcima razvrstanim prema spolu**

Deskriptivna statistika stresa po domenama u cjelokupnom uzorku, te u poduzorcima podijeljenim prema spolu prikazana je u tablici 4.12. Uočavaju se statistički značajne razlike u poimanju većine domena života kao stresnih kod učenika i učenica.

Učenici subjektivno procjenjuju zabrinutost za budućnost kao najstresniju domenu, nakon čega slijedi stres vezan uz školu, roditelje, slobodno vrijeme, poimanje samog sebe, vršnjake i stres vezan za odnose sa suprotnim spolom. Domene života koje učenici doživljavaju gotovo jednako stresno su domene koje su vezane za odnos s roditeljima, vršnjacima i samim sobom te stres vezan za slobodno vrijeme.

Učenice, jednako kao i učenici, procjenjuju zabrinutost za budućnost kao najstresniju domenu, nakon čega slijedi stres vezan uz školu, poimanje samog sebe, roditelje, slobodno vrijeme, vršnjake i stres vezan uz partnera. Domene života koje učenice doživljavaju gotovo jednako stresno su domene koje su vezane za odnos s roditeljima i stres vezan za slobodno vrijeme dok ostale životne domene učenice doživljavaju različito stresno (budućnost, školu, samog sebe, vršnjake te suprotan spol).

Učenice većinu životnih domena doživljavaju više stresno nego učenici, a samo stres koji je vezan za očekivanja uz partnera oba spola doživljavaju jednako stresno. Stoga je očekivano, procijenjena razina ukupnog stresa statistički značajno veća u učenica u odnosu na učenike.

**Tablica 4.12** Izraženost stresa vezanog uz pojedine domene života u cijelom uzorku i poduzorcima razvrstanih prema spolu

	cijeli uzorak			učenici			učenice			razlike prema spolu
	N	Ar. sredina	±SD	N	Ar. sredina	±SD	N	Ar. sredina	±SD	
stres vezan uz školu	903	2,61	0,83	357	2,48	0,88	546	2,70	0,78	<b>P&lt;0,001</b>
stres vezan uz budućnost	903	3,00	0,86	357	2,68	0,88	546	3,21	0,78	<b>P&lt;0,001</b>
stres vezan uz roditelje	903	2,31	0,99	357	2,18	0,92	546	2,39	1,02	<b>P=0,002</b>
stres vezan uz vršnjake	903	2,18	0,98	357	2,07	0,94	546	2,26	1,00	<b>P=0,005</b>
stres vezan uz slobodno vrijeme	903	2,25	0,84	357	2,15	0,83	546	2,32	0,84	<b>P=0,004</b>
stres vezan uz partnera	903	1,95	0,85	357	1,92	0,83	546	1,97	0,86	P=0,392
stres vezan uz samog sebe	903	2,42	0,94	357	2,14	0,92	546	2,60	0,91	<b>P&lt;0,001</b>
ukupni stress	903	2,39	0,73	357	2,22	0,73	546	2,49	0,70	<b>P&lt;0,001</b>

#### **4.5.2 Korelacijske analize stresa po domenama života i koncentracija salivarnog kortizola, indeksa cirkadijalnog ritma lučenja i aktivnosti alfa-amilaze u poduzorcima razvrstanim prema spolu**

U tablicama 4.13 i 4.14 prikazani su koeficijenti korelacije koncentracija salivarnog kortizola, indeksa cirkadijalnog ritma lučenja, aktivnosti alfa-amilaze sa stresom kroz pojedine domene života.

Korelacijske analize pokazale su da ne postoji statistički značajna povezanost doživljaja stresa u većini domena života i analiziranih salivarnih varijabli među učenicima, niti među učenicama. Rezultati ukazuju na slabu pozitivnu povezanost zabrinutosti za budućnost i koncentracije salivarnog kortizola 30 do 45 minuta nakon buđenja ( $SSC_{30-45}$ ), kao i stresa koji je vezan za školu i cirkadijalnog smanjenja linearne krivulje kortizola (DCD) među učenicima te vrlo slabu pozitivnu povezanost doživljaja stresa povezanim sa zabrinutošću za budućnost i odgovora kortizola na buđenje (CAR) među učenicama.

**Tablica 4.13** Korelacije između stresa vezanog uz pojedine domene života, koncentracija salivarnog kortizola, indeksa cirkadijalnog ritma lučenja i aktivnosti alfa-amilaze u uzorku učenika

	SCC <sub>0</sub>	SCC <sub>30-45</sub>	SCC <sub>večer</sub>	CAR	DCD	AUC <sub>G</sub>	sAA
stres vezan uz školu	0,101	0,056	-0,076	-0,022	<b>0,115*</b>	0,006	-0,014
stres vezan uz budućnost	0,045	<b>0,117*</b>	-0,025	0,082	0,023	0,093	-0,065
stres vezan uz roditelje	0,051	0,062	-0,047	0,022	0,043	0,028	-0,111
stres vezan uz vršnjake	-0,004	0,093	-0,033	0,103	-0,015	0,058	-0,102
stres vezan uz slobodno vrijeme	0,036	0,066	-0,045	0,044	0,015	0,028	-0,084
stres vezan uz partnera	0,018	0,052	0,004	0,038	-0,010	0,047	-0,115
stres vezan uz samog sebe	0,037	0,069	0,007	0,045	-0,006	0,050	-0,107
ukupni stress	0,047	0,090	-0,035	0,057	0,024	0,055	-0,108

\*P<0.05

SCC<sub>0</sub> - koncentracija salivarnog kortizola po buđenju, SCC<sub>30-45</sub> - koncentracija salivarnog kortizola 30 do 45 minuta nakon buđenja, SCC<sub>večer</sub> - koncentracija salivarnog kortizola neposredno prije lijeganja, CAR - odgovor kortizola na buđenje, DCD - cirkadijalno smanjenje kortizola, AUC<sub>G</sub> - površina ispod krivulje u odnosu na nultu razinu, sAA - salivarna α-amilaza.



**Tablica 4.14** Korelacije između stresa vezanog uz pojedine domene života, koncentracija salivarnog kortizola, indeksa cirkadijalnog ritma lučenja i aktivnosti alfa-amilaze u uzorku učenica

	SCC <sub>0</sub>	SCC <sub>30-45</sub>	SCC <sub>večer</sub>	CAR	DCD	AUC <sub>G</sub>	sAA
stres vezan uz školu	0,004	-0,029	-0,003	-0,029	0,000	-0,021	0,059
stres vezan uz budućnost	-0,002	0,083	-0,048	<b>0,086*</b>	0,022	0,055	0,028
stres vezan uz roditelje	0,057	-0,019	-0,050	-0,063	0,071	-0,019	0,040
stres vezan uz vršnjake	0,036	0,007	-0,004	-0,019	0,042	0,004	0,031
stres vezan uz slobodno vrijeme	0,057	0,004	-0,012	-0,040	0,054	0,005	0,001
stres vezan uz partnera	0,005	0,006	-0,009	0,005	0,021	-0,017	-0,008
stres vezan uz samog sebe	0,046	0,045	-0,008	0,011	0,052	0,024	0,039
ukupni stres	0,041	0,020	-0,023	-0,010	0,052	0,007	0,035

\*P<0.05

SCC<sub>0</sub> - koncentracija salivarnog kortizola po buđenju, SCC<sub>30-45</sub> - koncentracija salivarnog kortizola 30 do 45 minuta nakon buđenja, SCC<sub>večer</sub> - koncentracija salivarnog kortizola neposredno prije lijanja, CAR - odgovor kortizola na buđenje, DCD - cirkadijalno smanjenje kortizola, AUC<sub>G</sub> - površina ispod krivulje u odnosu na nultu razinu, sAA - salivarna α-amilaza.

#### **4.5.3 Analiza načina suočavanja sa stresom u cjelokupnom uzorku i poduzorcima razvrstanim prema spolu**

Deskriptivna statistika načina suočavanja sa stresom cjelokupnog uzorka i poduzoraka podijeljenih prema spolu prikazana je u tablici 4.15. Analiza je pokazala da se učenici i učenice razlikuju po načinu suočavanja sa stresom.

Učenice najučestalije koriste aktivno suočavanje sa stresom dok nakon njega slijedi unutarne suočavanje i najmanje korišteno povlačenje kao način suočavanja.

Učenici pak koriste aktivno i unutarne suočavanje jednako učestalo nakon čega slijedi povlačenje, kao najmanje korišten način suočavanja sa stresom.

Učenice koriste više aktivno suočavanje sa stresom od učenika, dok unutarne suočavanje i povlačenje kao način suočavanja sa stresom podjednako koriste oba spola.

**Tablica 4.15** Zastupljenost različitih načina suočavanja sa stresom u cijelom uzorku i poduzorcima prema spolu

	cijeli uzorak			učenici			učenice			razlike prema spolu
	N	Ar. sred.	±SD	N	Ar. sred.	±SD	N	Ar. sred.	±SD	
aktivno suočavanje	903	0,23	0,14	357	0,21	0,14	546	0,24	0,14	<b>P=0,001</b>
unutarnje suočavanje	903	0,22	0,14	357	0,21	0,14	546	0,22	0,14	P=0,110
povlačenje	903	0,15	0,11	357	0,14	0,11	546	0,15	0,11	P=0,140

#### **4.5.4 Korelacijske analize različitih načina suočavanja sa stresom s koncentracijama salivarnog kortizola, indeksa cirkadijalnog ritma lučenja i aktivnosti alfa-amilaze u uzorku učenika i učenica**

U tablicama 4.16 i 4.17 prikazani su koeficijenti korelacije koncentracija salivarnog kortizola, indeksa cirkadijalnog ritma lučenja, aktivnosti alfa-amilaze s načinima suočavanja sa stresom.

Korelacijskim analizama dokazana je slaba pozitivna povezanost aktivnog načina suočavanje s odgovorom kortizola na buđenje (CAR), a negativna povezanost povlačenja, kao načina suočavanja, s vrijednostima koncentracije kortizola neposredno prije ližeganja ( $SCC_{\text{večer}}$ ) u učenika. Nisu potvrđene povezanosti između različitih načina suočavanja sa stresom i koncentracija salivarnog kortizola, indeksa i aktivnosti  $\alpha$ -amilaze u učenika, kao niti unutarnjeg suočavanja sa stresom u učenika.

**Tablica 4.16** Korelacije između različitih načina suočavanja sa stresom, koncentracija salivarnog kortizola, indeksa cirkadijalnog ritma lučenja i aktivnosti alfa-amilaze u uzorku učenika

	SCC <sub>0</sub>	SCC <sub>30-45</sub>	SCC <sub>večer</sub>	CAR	DCD	AUC <sub>G</sub>	sAA
aktivno suočavanje	-0,044	0,078	-0,097	<b>0,120*</b>	0,022	0,040	0,028
unutarnje suočavanje	0,001	0,067	-0,029	0,072	0,012	0,069	0,030
povlačenje	-0,013	0,027	<b>-0,197**</b>	0,050	0,087	-0,037	0,036

**Tablica 4.17** Korelacije između različitih načina suočavanja sa stresom, koncentracija salivarnog kortizola, indeksa cirkadijalnog ritma lučenja i aktivnosti alfa-amilaze u uzorku učenika

	SCC <sub>0</sub>	SCC <sub>30-45</sub>	SCC <sub>večer</sub>	CAR	DCD	AUC <sub>G</sub>	sAA
aktivno suočavanje	0,010	0,052	0,012	0,038	0,014	0,050	-0,027
unutarnje suočavanje	0,009	0,038	0,028	0,026	0,015	0,031	-0,049
povlačenje	-0,004	0,043	0,028	0,042	-0,013	0,040	-0,057

\*P<0.05; \*\* P<0.01

SCC<sub>0</sub> - koncentracija salivarnog kortizola po buđenju, SCC<sub>30-45</sub> - koncentracija salivarnog kortizola 30 do 45 minuta nakon buđenja, SCC<sub>večer</sub> - koncentracija salivarnog kortizola neposredno prije lijeganja, CAR - odgovor kortizola na buđenje, DCD - cirkadijalno smanjenje kortizola, AUC<sub>G</sub> - površina ispod krivulje u odnosu na nultu razinu, sAA - salivarna  $\alpha$ -amilaza.

## 4.6 Analize genskih polimorfizama

### 4.6.1 Učestalost alela gena za mineralokortikoidni (MR), glukokortikoidni receptor (GR) te vezni protein 5 za FK506 u cjelokupnom uzorku i poduzorcima razvrstanim prema spolu

Učestalosti ispitivanih alela za mineralokortikoidni (MR), glukokortikoidni (GR) receptor i vezni protein 5 za FK506 u cjelokupnom uzorku učenika i poduzorcima prema spolu prikazane su u tablici 4.18.

Najučestaliji alel u cjelokupnom uzorku učenika za polimorfizam rs5522 je A (91,12 %), za rs6189 također A (91,25 %), za rs6190 je G (96,88 %) te C (68,13 %) za rs1360780. Slična raspodjela učestalosti uočena je i u poduzorcima učenika i učenica.

**Tablica 4.18** Učestalost alela za tri ispitivana polimorfizma jednog nukleotida u cjelokupnom uzorku učenika i poduzorcima prema spolu (N=400)

SNP	Alel	učestalost ukupno		učestalost učenici		učestalost učenice	
		N	%	N	%	N	%
rs5522	A	729	91,12	361	91,16	368	91,09
	G	71	8,88	35	8,84	36	8,91
rs6189	A	730	91,25	361	91,16	369	91,34
	G	70	8,75	35	8,84	35	8,66
rs6190	G	775	96,88	380	95,96	395	97,77
	A	25	3,12	16	4,04	9	2,23
rs1360780	C	545	68,13	274	69,19	271	67,08
	T	255	31,87	122	30,81	133	32,92

$\chi^2$  test; rezultati su prikazani kao broj (N) i postotak (%) ispitanika s određenim alelom

#### 4.6.2 Učestalost genotipova i testiranje pokoravanja Hardy-Weinbergovom zakonu ravnoteže u genima za mineralokortikoidni (MR), glukokortikoidni receptor (GR) te vezni protein 5 za FK506 u cjelokupnom uzorku i poduzorcima razvrstanim prema spolu

Učestalosti ispitivanih genotipova i testiranje pokoravanja Hardy-Weinbergovom zakonu ravnoteže gena za mineralokortikoidni (MR), glukokortikoidni (GR) receptor te vezni protein 5 za FK506 u cjelokupnom uzorku učenika prikazani su u tablici 4.19.

Najučestaliji genotipovi u cjelokupnom uzorku su AA za polimorfizam rs5522, AA za rs6189, GG za rs6190 te CC za rs1360780 polimorfizam. Uočene i očekivane frekvencije genotipova polimorfizma gena za MR i GR su u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži, osim za polimorfizam rs1360780 gena za *FKBP5* ( $P=0,017$ ).

**Tablica 4.19** Učestalost genotipova za tri ispitivana polimorfizma jednog nukleotida i testiranje pokoravanja Hardy-Weinbergovom zakonu ravnoteže  $\chi^2$  testom u cjelokupnom uzorku ( $N=400$ )

SNP	genotipovi	učestalost		$\chi^2$	P
		N uočeni	N očekivani		
rs5522	AA	335	332,2	3,103	0,078
	AG	59	64,7		
	GG	6	3,2		
rs6189	AA	335	333,1	1,472	0,225
	AG	60	63,9		
	GG	5	3,1		
rs6190	GG	376	375,4	1,013	0,314
	AG	23	24,2		
	AA	1	0,4		
rs1360780	CC	196	185,6	5,690	<b>0,017</b>
	CT	153	173,7		
	TT	51	40,6		

$\chi^2$  test, uz 1 stupanj slobode  $df=1$ ; rezultati su prikazani kao broj (N) ispitanika s određenim genotipom

Učestalosti ispitivanih genotipova i testiranje pokoravanju Hardy-Weinbergovom zakonu ravnoteže gena za mineralokortikoidni (MR), glukokortikoidni (GR) receptor te vezni protein 5 za FK506 u uzorku učenika prikazani su u tablici 4.20.

Najučestaliji genotipovi u uzorku učenika su AA za polimorfizam rs5522, AA za rs6189, GG za rs6190 te CC za rs1360780 polimorfizam. Uočene i očekivane frekvencije genotipova tri polimorfizma rs5522, rs6190 te rs1360780 nisu u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži dok one za rs6189 jesu ( $P=0,199$ ).

**Tablica 4.20** Učestalost genotipova za tri ispitivana polimorfizma jednog nukleotida i testiranje pokoravanja Hardy –Weinbergovom zakonu ravnoteže  $\chi^2$  testom u uzorku učenika (N=200)

SNP	genotipovi	učestalost učenici		$\chi^2$	P
		N uočeni	N očekivani		
rs5522	AA	167	164,5	4,682	<b>0,030</b>
	AG	27	31,9		
	GG	4	1,5		
rs6189	AA	166	164,5	1,643	0,199
	AG	29	31,9		
	GG	3	1,5		
rs6190	GG	182	179,6	10,690	<b>0,001</b>
	AG	16	20,8		
	AA	0	0,6		
rs1360780	CC	101	94,8	4,282	<b>0,039</b>
	CT	72	84,4		
	TT	25	18,8		

$\chi^2$  test, uz 1 stupanj slobode  $df=1$ ; rezultati su prikazani kao broj (N) ispitanika s određenim genotipom



Učestalosti ispitivanih genotipova i testiranje pokoravanju Hardy-Weinbergovom zakonu ravnoteže gena za mineralokortikoidni (MR), glukokortikoidni (GR) receptor te vezni protein 5 za FK506 u uzorku učenica prikazani su u tablici 4.21.

Uočene učestalosti genotipova za tri polimorfizma rs5522, rs6189 te rs1360780 su u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži, dok za rs6190 postoji odstupanje od HW zakona ravnoteže ( $P=0,004$ ).

**Tablica 4.21** Učestalost genotipova za tri ispitivana polimorfizma jednog nukleotida i testiranje pokoravanja Hardy –Weinbergovom zakonu ravnoteže  $\chi^2$  testom u uzorku učenica ( $N=200$ )

SNP	genotipovi	učestalost učenice		$\chi^2$	P
		N uočeni	N očekivani		
rs5522	AA	168	167,56	0,118	0,731
	AG	32	32,8		
	GG	2	1,6		
rs6189	AA	169	168,5	0,185	0,667
	AG	31	32		
	GG	2	1,5		
rs6190	GG	194	193,1	8,448	<b>0,004</b>
	AG	7	8,8		
	AA	1	0,1		
rs1360780	CC	95	90,9	1,713	0,191
	CT	81	89,2		
	TT	26	21,9		

$\chi^2$  test, uz 1 stupanj slobode  $df=1$ ; rezultati su prikazani kao broj (N) ispitanika s određenim genotipom

#### **4.6.3 Analize varijance pojedinačnih SNP lokusa i fenotipskih varijabli lučenja salivarnog kortizola u cjelokupnom uzorku i poduzorcima razvrstanim prema spolu**

U tablici 4.22 prikazane su koncentracije salivarnog kortizola i indeksa cirkadijalnog ritma lučenja kortizola za pojedine genotipove u genima za mineralokortikoidni (MR), glukokortikoidni receptor (GR) te FKBP5 na cjelokupnom uzorku, dok su u tablicama 4.23 i 4.24 prikazane koncentracije salivarnog kortizola i indeksa cirkadijalnog ritma lučenja kortizola za navedene genotipove u poduzorcima razvrstanim prema spolu. Zbog male učestalosti genotipa GG polimorfizma rs5522, ispitanici s genotipom AG i GG svrstani su u istu podskupinu. Također, zbog male učestalosti genotipa GG polimorfizma rs6189 i AA polimorfizma rs6190, ispitanici su združeni u iste podskupine (AG/GG, odnosno AG/AA).

Za polimorfizam rs5522 gena *NR3C2* za mineralokortikoidni receptor potvrđena je statistički značajna razlika u koncentraciji salivarnog kortizola po buđenju u ispitanika s genotipom AA u odnosu na ispitanike s genotipovima AG/GG ( $P=0,036$ ), pri čemu su koncentracije kortizola ispitanika s genotipom AA bile značajno niže. Također, za isti polimorfizam gena *NR3C2* uočena je statistički značajna razlika u vrijednostima indeksa cirkadijalnog ritma CAR (značajno je viši za genotip AA), dok je razlika u DCD-u bila granična (granično snižen za genotip AA). Nije potvrđena statistički značajna razlika povezanosti ostalih koncentracija salivarnog kortizola ( $SCC_{30-45}$ ,  $SCC_{večer}$ ) i indeksa  $AUC_G$  s genotipovima polimorfizma rs5522. Povezanost ostalih varijabli lučenja kortizola s genotipovima za tri ispitivana polimorfizma (rs6189, rs6190 i rs1360780) nije potvrđena.

U poduzorcima učenika i učenica nije bilo statistički značajnih razlika u koncentracijama salivarnog kortizola kao niti indeksa cirkadijalnog ritma lučenja s pojedinim genotipovima za sva četiri ispitana polimorfizma.

**Tablica 4.22** Koncentracije salivarnog kortizola, indeksi cirkadijalnog ritma lučenja kortizola i genotipovi u genima za mineralokortikoidni (MR), glukokortikoidni receptor (GR) i FKBP5 u cjelokupnom uzorku

	SCC <sub>0</sub> (nmol/l)	P	SCC <sub>30-45</sub> (nmol/l)	P	SCC <sub>večer</sub> (nmol/l)	P	CAR	P	DCD	P	AUC <sub>G</sub>	P
<i>rs5522</i>												
AA	13,54±8,67	<b>0,036</b>	18,48±11,49	0,641	6,73±3,53	0,466	4,61±9,59	<b>0,021</b>	0,44±0,53	0,050	201,39±114,76	0,400
AG/GG	15,52±6,95		18,69±9,49		6,84±3,17		1,64±9,45		0,52±0,51		193,85±83,85	
<i>rs6189</i>												
AA	13,90±8,39	0,915	18,56±11,01	0,770	6,73±3,55	0,487	4,50±9,32	0,438	0,46±0,52	0,946	200,62±108,09	0,460
AG/GG	13,21±7,48		18,29±8,69		6,98±3,06		2,87±9,35		0,42±0,48		185,84±104,54	
<i>rs6190</i>												
GG	13,90±8,39	0,915	18,54±11,47	0,985	6,73±3,52	0,254	4,39±9,35	0,683	0,47±0,53	0,889	200,52±107,99	0,666
AG/AA	13,21±7,48		18,62±9,41		7,03±3,04		4,19±9,41		0,42±0,31		186,31±106,33	
<i>rs1360780*</i>												
CC	13,92±9,29	0,880	17,71±11,46	0,160	6,37±3,24	0,067	4,36±8,49	0,171	0,48±0,55	0,728	187,18±116,86	0,066
TT	15,59±7,70		20,80±14,57		6,81±3,94		6,10±11,70		0,48±0,46		226,99±96,03	
CT	13,41±7,41		18,12±10,32		6,95±3,25		3,61±9,71		0,43±0,47		198,27±90,13	

SCC<sub>0</sub> - koncentracija salivarnog kortizola po buđenju, SCC<sub>30-45</sub> - koncentracija salivarnog kortizola 30 do 45 minuta nakon buđenja, SCC<sub>večer</sub> - koncentracija salivarnog kortizola neposredno prije lijeganja, CAR- odgovor kortizola na buđenje, DCD - cirkadijalno smanjenje kortizola, AUC<sub>G</sub> - površina ispod krivulje u odnosu na nultu razinu, IQR- interkvartilni raspon. Rezultati su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon između prvog i trećeg kvartila).

\*Kruskal–Wallis test, ostali polimorfizmi testirani Mann–Whitney U testom.

**Tablica 4.23** Koncentracije salivarnog kortizola, indeksi cirkadijalnog ritma lučenja kortizola i genotipovi u genima za mineralokortikoidni (MR), glukokortikoidni receptor (GR) i FKBP5 u uzorku učenika

	SCC <sub>0</sub> (nmol/l)	P	SCC <sub>30-45</sub> (nmol/l)	P	SCC <sub>večer</sub> (nmol/l)	P	CAR	P	DCD	P	AUC <sub>G</sub>	P
<i>rs5522</i>												
AA	13,67±7,66	0,284	17,59±9,64	0,698	6,57±3,28	0,234	4,33±8,12	0,071	0,44±0,54	0,162	194,38±89,27	0,215
AG/GG	15,09±7,72		18,68±7,97		6,81±3,06		1,63±9,38		0,54±0,65		179,65±85,47	
<i>rs6189</i>												
AA	13,57±7,90	0,191	17,63±9,38	0,730	6,62±3,30	0,284	3,92±8,07	0,350	0,47±0,55	0,432	194,38±89,82	0,937
AG/GG	15,17±6,53		18,46±7,60		7,01±2,97		2,46±7,50		0,46±0,50		186,08±90,43	
<i>rs6190</i>												
GG	13,57±7,90	0,191	17,54±9,19	0,470	6,58±3,26	0,100	3,78±8,01	0,634	0,47±0,55	0,587	193,12±87,08	0,620
AG/AA	15,17±6,53		18,66±9,13		7,17±2,95		3,53±8,92		0,44±0,46		187,07±104,19	
<i>rs1360780*</i>												
CC	13,77±7,43	0,925	16,94±7,88	0,244	6,52±3,43	0,285	3,31±7,6	0,173	0,48±0,50	0,777	181,86±95,45	0,096
TT	15,78±7,12		19,72±11,45		6,54±3,50		5,93±11,10		0,44±0,48		220,32±89,23	
CT	13,52±9,35		17,99±10,65		6,84±3,00		3,61±10,01		0,44±0,66		196,36±81,53	

SCC<sub>0</sub> - koncentracija salivarnog kortizola po buđenju, SCC<sub>30-45</sub> - koncentracija salivarnog kortizola 30 do 45 minuta nakon buđenja, SCC<sub>večer</sub> - koncentracija salivarnog kortizola neposredno prije lijeganja, CAR - odgovor kortizola na buđenje, DCD - cirkadijalno smanjenje kortizola, AUC<sub>G</sub> - površina ispod krivulje u odnosu na nultu razinu, IQR- interkvartilni raspon. Rezultati su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon između prvog i trećeg kvartila).

\*Kruskal–Wallis test, ostali polimorfizmi testirani Mann–Whitney U testom.

**Tablica 4.24** Koncentracije salivarnog kortizola, indeksi cirkadijalnog ritma lučenja kortizola i genotipovi u genima za mineralokortikoidni (MR), glukokortikoidni receptor (GR) i FKBP5 u uzorku učenica

	SCC <sub>0</sub> (nmol/l)	P	SCC <sub>30-45</sub> (nmol/l)	P	SCC <sub>večer</sub> (nmol/l)	P	CAR	P	DCD	P	AUC <sub>G</sub>	P
<i>rs5522</i>												
AA	13,49±9,48	0,080	19,52±14,23	0,676	6,74±3,68	0,925	5,37±9,50	0,106	0,43±0,52	0,159	210,67±138,22	0,842
AG/GG	15,64±6,07		18,73±9,52		6,87±3,45		2,18±9,02		0,49±0,42		210,30±85,07	
<i>rs6189</i>												
AA	14,03±8,88	0,121	19,43±13,44	0,601	6,76±3,58	0,832	5,08±9,56	0,751	0,46±0,48	0,231	211,84±124,80	0,383
AG/GG	10,84±2,81		17,13±17,13		6,62±4,08		6,81±18,04		0,26±0,22		182,88±118,20	
<i>rs6190</i>												
GG	14,03±8,88	0,121	19,43±13,44	0,601	6,76±3,58	0,832	5,08±9,56	0,751	0,46±0,48	0,231	211,84±124,80	0,383
AG/AA	10,84±2,81		17,13±17,13		6,62±4,08		6,81±18,04		0,26±0,22		182,88±118,20	
<i>rs1360780*</i>												
CC	13,99±11,21	0,853	18,92±14,33	0,498	6,07±2,77	0,272	5,57±9,99	0,409	0,45±0,62	0,815	214,38±134,88	0,493
TT	15,10±7,34		21,72±15,95		6,92±5,00		6,39±13,49		0,52±0,48		236,54±148,38	
CT	13,39±6,83		18,37±9,96		7,06±3,99		3,61±9,47		0,43±0,41		202,86±81,53	

SCC<sub>0</sub> - koncentracija salivarnog kortizola po buđenju, SCC<sub>30-45</sub> - koncentracija salivarnog kortizola 30 do 45 minuta nakon buđenja, SCC<sub>večer</sub> - koncentracija salivarnog kortizola neposredno prije lijeganja, CAR - odgovor kortizola na buđenje, DCD - cirkadijalno smanjenje kortizola, AUC<sub>G</sub> - površina ispod krivulje u odnosu na nultu razinu, IQR- interkvartilni raspon. Rezultati su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon između prvog i trećeg kvartila).

\*Kruskal–Wallis test, ostali polimorfizmi testirani Mann–Whitney U testom.

#### 4.6.4 Analize povezanosti pojedinačnih SNP lokusa i fenotipskih varijabli lučenja salivarnog kortizola

U tablicama 4.25 do 4.30 prikazani su rezultati analiza povezanosti četiri polimorfizama jednog nukleotida (SNP) gena za mineralokortikoidni (MR), glukokortikoidni receptor (GR) te vezni protein 5 za FK506 (FKBP5) s koncentracijama salivarnog kortizola i indeksima cirkadijalnog ritma lučenja kortizola na cjelokupnom uzorku.

U ispitivanom uzorku učenika potvrđena je povezanost polimorfizma rs6190 gena *NR3C1* za glukokortikoidni receptor s odgovorom kortizola na buđenje ( $P=0,019$ ), dok za ostale ispitivane polimorfizme nije potvrđena povezanost niti s jednom varijablom lučenja salivarnog kortizola.

**Tablica 4.25** Analize povezanosti pojedinačnih SNP lokusa s koncentracijama salivarnog kortizola po buđenju ( $SCC_0$ )

$SCC_0$ (N=379)							
CHR	SNP	BP	$\beta$	SE	$R^2$	T	P
4	rs5522	148436323	-13,29	11,61	0,003462	-1,144	0,253
5	rs6189	143278056	-14,66	19,44	0,001506	-0,754	0,451
5	rs6190	143400772	-20,12	12,00	0,007405	-1,677	0,094
6	rs1360780	35639794	6,98	7,12	0,002540	0,980	0,328

SNP - polimorfizam jedne baze, BP - fizički položaj izražen u parovima baza,  $\beta$  - regresijski koeficijent, SE - standardna pogreška,  $R^2$  - udio varijabilnosti prikazan regresijskom jednadžbom, T - Wald test (baziran na t-distribuciji).

**Tablica 4.26** Analize povezanosti pojedinačnih SNP lokusa s koncentracijama salivarnog kortizola 30-45 minuta nakon buđenja ( $SCC_{30-45}$ )

$SCC_{30-45}$ (N=398)							
CHR	SNP	BP	$\beta$	SE	$R^2$	T	P
4	rs5522	148436323	-1,09	1,08	0,002571	-1,010	0,313
5	rs6189	143278056	-0,89	1,84	0,000589	-0,483	0,629
5	rs6190	143400772	-1,75	1,08	0,006643	-1,627	0,105
6	rs1360780	35639794	0,42	0,65	0,001015	0,634	0,526

SNP - polimorfizam jedne baze, BP - fizički položaj izražen u parovima baza,  $\beta$  - regresijski koeficijent, SE - standardna pogreška,  $R^2$  - udio varijabilnosti prikazan regresijskom jednadžbom, T - Wald test (baziran na t-distribuciji).

**Tablica 4.27** Analize povezanosti pojedinačnih SNP lokusa s koncentracijama salivarnog kortizola neposredno prije lijeganja ( $SCC_{večer}$ )

$SCC_{večer}$ (N=397)							
CHR	SNP	BP	$\beta$	SE	$R^2$	T	P
<b>4</b>	rs5522	148436323	-0,20	0,55	0,000339	-0,366	0,715
<b>5</b>	rs6189	143278056	-0,21	0,94	0,000125	-0,222	0,825
<b>5</b>	rs6190	143400772	-0,12	0,55	0,000119	-0,216	0,829
<b>6</b>	rs1360780	35639794	0,06	0,33	0,000009	0,184	0,855

SNP - polimorfizam jedne baze, BP - fizički položaj izražen u parovima baza,  $\beta$  - regresijski koeficijent, SE - standardna pogreška,  $R^2$  - udio varijabilnosti prikazan regresijskom jednadžbom, T - Wald test (baziran na t-distribuciji).

**Tablica 4.28** Analize povezanosti pojedinačnih SNP lokusa s odgovorom kortizola na buđenje (CAR)

CAR (N=398)							
CHR	SNP	BP	$\beta$	SE	$R^2$	T	P
<b>4</b>	rs5522	148436323	-1,32	0,96	0,004714	-1,370	0,172
<b>5</b>	rs6189	143278056	-0,82	1,64	0,000633	-0,501	0,617
<b>5</b>	rs6190	143400772	-2,25	0,96	0,013740	-2,345	<b>0,019</b>
<b>6</b>	rs1360780	35639794	0,47	0,58	0,001614	0,800	0,424

SNP - polimorfizam jedne baze, BP - fizički položaj izražen u parovima baza,  $\beta$  - regresijski koeficijent, SE - standardna pogreška,  $R^2$  - udio varijabilnosti prikazan regresijskom jednadžbom, T - Wald test (baziran na t-distribuciji).

**Tablica 4.29** Analize povezanosti pojedinačnih SNP lokusa s cirkadijalnim smanjenjem kortizola (DCD)

DCD (N=380)							
CHR	SNP	BP	$\beta$	SE	$R^2$	T	P
<b>4</b>	rs5522	148436323	-0,01	0,049	0,000007	-0,157	0,875
<b>5</b>	rs6189	143278056	0,01	0,08	0,000007	0,167	0,868
<b>5</b>	rs6190	143400772	0,02	0,05	0,000289	0,330	0,741
<b>6</b>	rs1360780	35639794	0,001	0,08	0,0000001	0,015	0,988

SNP - polimorfizam jedne baze, BP - fizički položaj izražen u parovima baza,  $\beta$  - regresijski koeficijent, SE - standardna pogreška,  $R^2$  - udio varijabilnosti prikazan regresijskom jednadžbom, T - Wald test (baziran na t-distribuciji).



**Tablica 4.30** Analize povezanosti pojedinačnih SNP lokusa s površinom ispod krivulje ( $AUC_G$ )

$AUC_G$ (N=379)							
CHR	SNP	BP	$\beta$	SE	$R^2$	T	P
4	rs5522	148436323	-13,29	11,61	0,003462	-1,144	0,253
5	rs6189	143278056	-14,66	19,44	0,001506	-0,754	0,451
5	rs6190	143400772	-20,12	12	0,007405	-1,677	0,094
6	rs1360780	35639794	6,975	7,119	0,00254	0,9798	0,328

SNP - polimorfizam jedne baze, BP - fizički položaj izražen u parovima baza,  $\beta$  - regresijski koeficijent, SE - standardna pogreška,  $R^2$  - udio varijabilnosti prikazan regresijskom jednadžbom, T - Wald test (baziran na t-distribuciji).

## 5 RASPRAVA

Disregulacija HPAC osi uzrokovana stresom povezuje se s nizom različitih bolesti kao što su psihijatrijske<sup>52</sup>, kardiovaskularne<sup>51</sup>, maligne bolesti<sup>53,54</sup>, dijabetes<sup>50</sup>, debljina<sup>48</sup> te smanjenje kognitivnih funkcija<sup>49</sup>.

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati funkciju HPAC osi u bazalnim, nestimuliranim svakodnevnim okolnostima te utvrditi cirkadijalni ritam diurnalne sekrecije salivarnog kortizola i aktivnosti salivarne alfa-amilaze u zdravih učenika završnih razreda srednjih škola (N=903) u četiri najveća grada u Hrvatskoj (Zagreb, Split, Rijeka i Osijek).

Ovim istraživanjem dokazano je značajno povećanje koncentracija kortizola nakon buđenja te smanjenje koncentracije kortizola tijekom ostatka dana s najnižim koncentracijama prije lijeganja, a potvrđene su i različite koncentracije kortizola u učenika i učenica u jutarnjim satima. Spol, kao i ritam buđenja i lijeganja pokazali su se najvažnijim prediktorima kortizola. Učenice su imale višu koncentraciju jutarnjeg kortizola, jači odgovor kortizola na buđenje (CAR), izraženije cirkadijalno smanjenje kortizola (DCD) te veću površinu ispod krivulje (AUC<sub>G</sub>) u odnosu na učenike. Statistički značajna povezanost turnusa pohađanja nastave s većim koncentracijama diurnalnog ritma kortizola potvrđena je u učenika koji pohađaju prijednevni turnus. U istraživanju je, također, potvrđeno da učenice imaju statistički značajno veću izraženost ukupnog stresa vezanog uz pojedine domene života, ali i da više koriste aktivan način suočavanja sa stresom.

U ovom istraživanju sudjelovalo je 1833 učenika četvrtih razreda srednjih škola (gimnazija i strukovnih škola), od kojih je 1097 prikupilo i vratilo uzorke sline (tablica 4.1). Postotak povrata uzoraka sline u ovom istraživanju bio je (59,8 %). Uočava se da u istraživanjima s prikazanim postotkom povrata uzoraka sline on varira, od neočekivano niskih 25 % kao u Gotthenburgovom istraživanju do 93 % u Cebu Longitudinal Survey<sup>153</sup>. U istraživanju CARDIA prikupljeni su uzorci sline od 58 % ispitanika<sup>154</sup>, dok je tijekom NSDE istraživanja bilo prikupljeno 86 % uzoraka sline ispitanika<sup>155</sup>. Razlozi manjem povratu uzoraka u odnosu na očekivani, unatoč neopterećujućem protokolu i potpisanom pristanku svakog učenika za

sudjelovanje u istraživanju, mogu biti višestruki. Naime, tijekom prvog dana istraživanja obavljena su biometrijska mjerenja i popunjavanje upitnika, što se odvijalo za vrijeme trajanja nastave za koju su učenici bili ispričani. Za pretpostaviti je da je to, najvjerojatnije, bio značajan motiv za sudjelovanjem u istraživanju većem broja učenika koji slijedeći dan nisu dostavili uzorke sline. Također, je vjerojatno da bi postotak prikupljenih uzoraka bio i znatno veći da se učenike večer prije telefonskim pozivom ili sms porukom podsjetilo na obvezu povrata prikupljenih uzoraka sline. Treba naglasiti da, osim davanja povratne informacije o nalazu salivarnih biljega, antropometrijskim i fizioloških mjerenjima, učenicima nije bio ponuđen nikakav financijski niti bilo koji drugi motiv za sudjelovanjem u istraživanju. Uz to, dio učenika koji nisu htjeli sudjelovati u istraživanju usmeno su izrazili bojazan kako bi se uzorci sline mogli upotrijebiti u svrhu testiranja na droge. Stoga možemo pretpostaviti da se veći postotak povrata uzoraka sline u određenom broju istraživanja može povezati sa starijom životnom dobi, podsjećanjem ispitanika o važnosti prikupljanja uzoraka, a ne treba isključiti ni financijski motiv. Od ukupnog broja učenika koji su donijeli barem jedan uzorak njih 194 (10,6 %) isključeno je iz istraživanja, a zbog odstupanja od smjernica i preporuka epidemioloških istraživanja salivarnog kortizola<sup>36,144</sup>. Jedan od uzroka isključivanja iz istraživanja bilo je dokumentirano nepridržavanje protokola za uzimanje uzoraka sline (10 ispitanika; 0,5 %), a isključeni su i uzorci čije su izmjerene koncentracije kortizola te vrijeme uzorkovanja prelazili tri standardne devijacije iznad prosječnih vrijednosti dobivenih u ovom istraživanju (63 ispitanika; 3,4 %) čiji je vjerojatan uzrok također nepridržavanje protokola uzorkovanja. Ipak, ovo se ne može sa sigurnošću tvrditi obzirom da u ovom istraživanju nije korišten uređaj za praćenje usklađenosti vremena uzorkovanja s dokumentiranim vremenom prikupljanja uzoraka sline. U istraživanju koje je proveo Almeida sa suradnicima 2009. godine, dokazan je visok stupanj usklađenosti vremena uzorkovanja dobivenog sustavima za praćenje s dokumentiranim vremenom prikupljanja uzoraka sline od strane samih ispitanika (od 75 % uvečer do 95 % ujutro). U istraživanju koje se fokusiralo na pridržavanje protokola i kooperativnost u povratu uzoraka, ispitanici su bili podijeljeni u tri podskupine prema informiranosti, prvoj skupini bilo rečeno da su sva vremena uzorkovanja praćena, drugoj da su praćeni slučajnim odabirom, a trećem dijelu ispitanika da nisu uopće nadzirane, nisu utvrđene razlike u povratu uzoraka, dokumentiranom vremenu uzorkovanja niti u pridržavanju protokola uzorkovanja između tri skupine ispitanika<sup>156</sup>. Stoga, usporedbom broja učenika čiji su uzorci isključeni iz daljnjeg istraživanja može se zaključiti da je ovo istraživanje u skladu s rezultatima dobivenim u istraživanjima drugih autora.

Skupina učenika koja je prikupila uzorke sline po dobi je bila podudarna skupini koja nije prikupila i vratila niti jedan uzorak, što je u skladu s prethodno iznesenom pretpostavkom o dobi kao prediktoru povrata uzoraka. Spol je također bio prediktor uspješnosti povrata prikupljenih uzoraka, stoga što je veći broj učenika prikupio uzorke, što je u skladu s istraživanjima drugih autora<sup>158</sup>. Uz spol i određene demografske varijable, kao što je pohađanje gimnazije, bolji školski uspjeh i ponašanje u školi bile su značajno različite u skupini učenika koji su vratili odnosno nisu vratili niti jedan uzorak sline. Učenice iskazuju bolja školska postignuća u odnosu na učenike, u odnosu i na školski uspjeh i na ponašanje u školi (tablica 4.2). Dobiveni rezultati navode na zaključak kako su učenice, kao i bolji učenici, bili zainteresiraniji za sudjelovanje u istraživanju, što je u skladu i sa sličnim, do sada provedenim istraživanjima<sup>158,157,158</sup>.

Većina učenika, njih 93 %, ima najboljeg prijatelja ili prijateljicu, a nešto više od trećine (36 %) su u trenutku izvođenja istraživanja u romantičnoj vezi, od čega je veći broj učenica (tablica 4.2). Najveći broj učenika životni standard obitelji procjenjuje kao prosječan (81,80 %), s tim da je u toj skupini više učenica. Što se tiče zdravstvenih obilježja, više učenika redovito vježba i samoprocjenjuje zdravlje s većom prosječnom ocjenom nego učenice. Također, učenici su do trenutka izvođenja istraživanja imali više seksualnih partnera, više konzumiraju alkohol te više zlorabljavaju drogu dok nešto više učenica, u odnosu na muške kolege, redovito puši cigarete. Antropometrijske i fiziološke mjere (BMI, WHR, WHtR, sistolički i dijastolički tlak) bile su statistički značajno različite između spolova, sa svim navedenim mjerama većim u učenika.

U uzorku ispitanika, razvrstanih prema spolu, uočeno je postojanje statistički značajnih razlika između učenika i učenica u svim mjerama kortizola, kao i aktivnosti salivarne alfa-amilaze, osim koncentracije salivarnog kortizola neposredno prije ližeganja. Učenice su imale veće vrijednosti jutarnjih koncentracija salivarnog kortizola, kao i veći CAR, izraženije cirkadijalno smanjenje kortizola (DCD) te veći AUC<sub>G</sub> u odnosu na učenike (slika 4.1 i tablica 4.3). U istraživanjima u kojima je proučavan psihološki stresni podražaj ili nisu otkrivene razlike među spolovima ili su dokazane veće koncentracije salivarnog kortizola u muškaraca, kao odgovor na akutni psihološki stresni podražaj (npr. ispit na fakultetu, govor pred slušačima, mentalni matematički zadatak)<sup>159,160</sup>. Nadalje, istraživanja koja su mjerila bazalne koncentracije salivarnog kortizola u naturalističkim uvjetima (kao što je Bouma sa suradnicima 2009. godine) pokazala su da se jutarnje koncentracije SCC<sub>0</sub> i SCC<sub>30</sub> razlikuju prema spolu te da adolescentice imaju veće koncentracije nego adolescenti, a da istovremeno,

za razliku od naših rezultata, nije pronađena razlika u CAR-u<sup>161</sup>. Istraživanje koje je pronašlo povezanost muškog spola s nižim koncentracijama kortizola kod buđenja te niži CAR također je sukladno našim rezultatima<sup>162</sup>. Studija provedena na novorođenčadi ukazuje da su spolne razlike koncentracije salivarnog kortizola prisutne već i u novorođenačkoj dobi<sup>163</sup>. Može se pretpostaviti kako su razlike prema spolu uvjetovane strukturnim razlikama u limbičkim dijelovima mozga, različitostima kognitivne interpretacije stresnih podražaja, kao i koncentracijama spolnih hormona i globulina koji veže kortikosteroide (CBG-a). Pretpostavlja se da limbički sustav, kao dio centralnog nervnog sustava koji je odgovoran za emocionalno ponašanje, sudjeluje u odgovoru na stresni poticaj<sup>164</sup>. Istraživanja su također pokazala kako su hipokampalne strukture koje sudjeluju u kognitivnoj procjeni stresnog poticaja *spolno dimorfične*<sup>165</sup> što je potvrđeno i primjenom slikovnih tehnika u nekoliko istraživanja<sup>166</sup>. U adolescenciji, tijekom sazrijevanja, paralelno se odvijaju promjene i HPAC i HPG osi te se stoga kod interpretacije koncentracija kortizola mora razmotriti i fiziološka veza s HPG osi<sup>167</sup>. Budući se u istraživanju nisu mjerile koncentracije niti ACTH niti koncentracije spolnih hormona (estrogena, progesterona i testosterona) kao niti CBG-a, može se pretpostaviti da su i djelovanja spolnih hormona uzrokom različitih jutarnjih koncentracija kortizola. Utjecaj spolnih hormona posredovan je njihovom barem djelomičnom kontrolom aktivnosti ostalih endokrinih žlijezda u organizmu, posebice HPAC osi, a također, i međudjelovanjem i spolnih i glukokortikoidnih hormona, na neuroendokrinoj i na perifernoj razini<sup>168</sup>. Istraživanje provedeno na adolescentima u Nizozemskoj pokazalo je da se promjene u CAR-u mogu objasniti fizičkim razvojem u adolescenskoj dobi, zbog čega je CAR veći u djevojčica te se usklađeno sa spolnim razlikama u pubertetu očekuje veći CAR kod starijih u odnosu na mlađe adolescente<sup>169</sup>. Adolescentice su u fizičkom razvoju otprilike dvije godine naprednije od adolescenata iste dobi, pa stoga je i pronalazak većeg CAR-a u skladu s hipotezom o dobi<sup>170</sup>. Također, veći CAR može se smatrati dominantnim mehanizmom kojim se adolescentice pripremaju za suočavanje s izazovima koji će slijediti tijekom nadolazećeg dana<sup>42</sup>. Dobiveni rezultati CAR-a u skladu su s istraživanjima koja su pokazala da odgovor kortizola na buđenje u djece i adolescenata nije jednak onom u odraslih<sup>171</sup>. Može se pretpostaviti kako se promjene CAR-a pojavljuju kao dio normalnog fizičkog sazrijevanja u pubertetu, što potvrđuju dokazi o promjenama bazalnih aktivnosti HPAC osi u adolescenata<sup>171</sup>. Također, samo su jutarnje koncentracije veće u učenica dok se večernje, neposredno prije lijevanja, ne razlikuju među spolovima. Manje koncentracije večernjeg kortizola neophodne su zbog održavanja zdravog ritma spavanja i buđenja koji je sukladan izmjeni ciklusa dana i noći<sup>172</sup>. Visoke koncentracije večernjeg kortizola povezuju se s

Cushingovom bolešću, koja je karakterizirana hipertenzijom, hiperglikemijom, poremećajem sna, depresijom te pretilosti<sup>173</sup>. Addisonova bolest, zbog nedostatka kortizola, popraćena je simptomima gubitka tjelesne težine, hipotenzije, promjenama raspoloženja i hipoglikemije<sup>174</sup>. Budući su ciljnu skupinu ispitanika u ovom istraživanju činili učenici bez bilo kakve patološke simptomatologije, može se zaključiti kako je njihova sposobnost održanja fiziološkog cirkadijalnog ritma s niskim koncentracijama kortizola neposredno prije lijeganja, koja je važna kao priprema za san, visoko očuvana u oba spola jednako.

Rezultati aktivnosti alfa-amilaze također se razlikuju između učenika i učenica, učenici imaju statistički značajno veće vrijednosti u usporedbi s uenicama ( $P=0,04$ ). U istraživanju provedenom na odraslim ispitanicima iz 2004. godine nisu pronađene razlike među spolovima u bazalnim, nestimuliranim uvjetima<sup>175</sup>. Također, isti autor istraživao je i diurnalni ritam lučenja alfa-amilaze, a koji je zrcalno suprotan od diurnalnog lučenja kortizola, i ukazao je na povezanost kroničnog stresa s povećanom aktivnošću sAA, ali nije potvrdio razlike između spolova<sup>94</sup>. Istraživanja koja su uključivala mjerenje povećanja aktivnosti alfa-amilaze kao reakcije na standardizirane akutne stresore navode na zaključak kako se aktivnost amilaze ne razlikuje između muškaraca i žena<sup>176,177</sup>.

U ovom su istraživanju analizirani upitnici koji su se temeljili na subjektivnoj procjeni kroničnog stresa u svakodnevnom životu, a koji su pokazali kako su veći ukupni stres imale učenice pa su stoga imale i nižu aktivnost alfa-amilaze u mirovanju u odnosu na učenike. Sličnu su raspodjelu po spolu dobili Wolf i suradnici u istraživanju iz 2008. godine<sup>178</sup>. Ovi su autori istraživali kronični stres u djece (12-19 godina) pa su za razliku od akutnog stresa koji se povezuje s povišenom aktivnošću amilaze<sup>179</sup> pokazali kako se kronični stres može povezati sa smanjenom aktivnošću alfa-amilaze u mirovanju, što ukazuje na nižu aktivnost simpatikusa. Nadalje, više aktivnosti alfa-amilaze u učenika dobivene u ovom istraživanju možda se mogu objasniti i manjom veličinom žlijezda slinovnica u žena.

U istraživanju nije utvrđeno postojanje statistički značajnih razlika u uzorcima učenika koji pohađaju različite tipove škola, strukovne ili gimnazije, u svim mjerama koncentracija salivarnog kortizola, niti u aktivnosti salivarne alfa-amilaze (tablica 4.4 i slika 4.2). Pretpostavka o povišenim vrijednostima cirkadijalnog ritma lučenja kortizola i aktivnosti salivarne alfa-amilaze zbog većih obaveza i zahtjeva koji se postavljaju pred učenike gimnazija nije potvrđena, budući da nisu dokazane razlike u ovisnosti o tipu škole (gimnazije vs. strukovne škole). Razlog tome može se temeljiti na činjenici da su svi ispitanici bili zdravi,

bez znakova bilo kakve disfunkcije HPAC osi te da je, bez obzira na veće ili manje svakodnevne obveze, njihova sposobnost održavanja homeostaze visoko očuvana, neovisno o obvezama koje škola pred njih postavlja.

Statistički značajne razlike uočene su u uzorcima učenika u ovisnosti o tome jesu li pohađali prijedpodnevi ili poslijepodnevi turnus i to za koncentracije salivarnog kortizola 30 do 45 minuta nakon buđenja te za indekse cirkadijalnog ritma lučenja kortizola (CAR, DCD, AUC<sub>G</sub>), dok za koncentracije salivarnog kortizola po buđenju, neposredno prije ližanja i aktivnost sAA nisu uočene (tablica 4.5 i slika 4.3). Vrijeme buđenja i trajanje budnosti nije se razlikovalo u ukupnom uzorku učenika i učenica, ali su statistički značajne razlike utvrđene u vremenu buđenja i trajanju budnosti između učenika koji pohađaju različite turnuse. Povećanje koncentracije salivarnog kortizola 30 do 45 minuta nakon buđenja uzrokovano je samim procesom buđenja te je mjera osjetljivosti HPAC osi na prirodne izazove kao što je buđenje<sup>180</sup>. Fiziološka uloga povećanja koncentracija kortizola povezuje se s procesima iniciranim buđenjem, kao što su obnova svjesnosti i pune budnosti, promjene koncentracija hormona, mobilizacija lokomotornog sustava. U skladu s rezultatima dobivenim u ovom istraživanju su i rezultati istraživanja drugih istraživačkih skupina, u kojima je potvrđena povezanost ranijeg vremena buđenja s većim CAR-om<sup>181,182,183</sup>. U zdravoj populaciji, fiziološko povećanje CAR-a važno je zbog suočavanja sa specifičnim zahtjevima u nadolazećem danu i smanjivanja stresa te je povezano sa suočavanjem sa stresom<sup>184</sup>. Kako su se ispitanici koji su nastavu pohađali u prijedpodnevnom turnusu ranije budili i trebali su raniju pripremu za obveze koje ih očekuju tijekom dana, imali su i veći CAR. Istraživanje koje je proveo Fries sa suradnicima 2009. godine potvrdilo je utjecaj situacijskih čimbenika na CAR koji je bio povećan u ispitanika koji su osjećali pojačane zahtjeve na poslu ili općenito generalni stres. Povećani CAR povezan je sa subjektivnim emocijama prethodnog dana, prijetnjom, nedostatak kontrole, osamljenosti i ostalim negativnim osjećajima što ukazuju da CAR može imati pripremnu, homeostatsku ulogu<sup>185</sup>. U istraživanju Zoccola i suradnika (2011), u kojem je ispitivan CAR u studenata, dokazano je kako zabrinutost večer prije uzorkovanja znatno povećava CAR, pa je stoga za očekivati i da su učenici prijedpodnevnog turnusa zabrinutiji večer prije u odnosu na one učenike koji imaju još slobodno jutro za ispunjavanje školskih obveza<sup>186</sup>. Također, prisilno buđenje vjerojatno prisutno kod svih učenika u prijedpodnevnom turnusu, zasigurno je imalo utjecaj na povećanje CAR-a, što je u skladu i s istraživanjem Dettenborna i suradnika (2007)<sup>187</sup>.

Osim CAR-a, statistički značajne razlike uočene su i u diurnalnom nagibu krivulje ili cirkadijalnom smanjenju kortizola (DCD) između učenika u prije- i poslijepodnevnom turnusu. U interpretaciji ovakvog nalaza, potrebno je uzeti u obzir i trajanje budnosti, a koje se statistički razlikovalo među učenicima u različitim turnusima. Učenici u prijednevnom turnusu duže su bili budni i imali su niži DCD. Ovi su rezultati u skladu s istraživanjem Hoyta i suradnika iz 2015. godine, koje je pokazalo da se duže trajanje spavanja povezuje s izraženijim diurnalnim nagibom linearne krivulje kortizola<sup>164</sup>. Ranije provedena istraživanja također su definirala recipročnu vezu između trajanja spavanja i cirkadijalnog ritma lučenja kortizola, s više sati sna kao predikcijom jačeg diurnalnog nagiba linearne krivulje i niže razine zamora tijekom slijedećeg dana<sup>188</sup>. Štoviše, rezultati dobiveni iz laboratorijskih i iz epidemioloških istraživanja bili su usklađeni: kraće trajanje sna i slabija kvaliteta sna povezuju se s otupljenijom krivuljom te povećanim večernjim koncentracijama kortizola<sup>189</sup>. Rezultati povezanosti sa školskim obavezama pokazali su iste rezultate: veći  $AUC_G$  i CAR te strmiji (ili izraženiji) DCD u danima većih školskih obaveza<sup>190</sup>. Rezultati dobiveni u ovom istraživanju potvrđuju da se poslijepodnevni turnus, koji je povezan s dužim snom i manje stresnom pripremom za školske obveze tog dana, može povezati s izraženijim diurnalnim nagibom koji ukazuje na bolju (zdraviju) funkciju HPAC osi.

Indeks cirkadijalnog ritma lučenja kortizola,  $AUC_G$ , predstavlja ukupno lučenje kortizola tijekom cijelog dana, te je jedna od mjera diurnalnog lučenja. Veći  $AUC_G$  u učenika koji pohađaju prijednevni turnus ukazuje na veću koncentraciju kortizola tijekom dana pa se može zaključiti kako su učenici u prijednevnom turnusu, najvjerojatnije, u stanju povišenog stresa u odnosu na učenike u poslijepodnevnom turnusu. Istraživanja  $AUC_G$  i dnevnog ritma lučenja kortizola važna su zbog spoznaje da je niži  $AUC_G$  povezan s obrascem zdravog dnevnog ritma u zdravih osoba<sup>191</sup>. Interpretirajući sve indekse diurnalnog ritma lučenja kortizola u učenika prijednevnog turnusa (veći CAR, niže cirkadijalno smanjenje kortizola DCD te veći  $AUC_G$ ) može se pretpostaviti kako nastava u prijednevnom turnusu predstavlja trajni stresor za učenike. Brojna su istraživanja koja niži DCD<sup>192</sup>, povećani CAR<sup>193</sup> i  $AUC_G$ <sup>194</sup> povezuju sa stalno prisutnim kroničnim stresom te nepovoljnijim zdravstvenim ishodima.

Raspodjele koncentracija salivarnog kortizola kroz tri vremenske točke, indeksi cirkadijalnog ritma i aktivnost alfa-amilaze u ispitivanom uzorku učenika i učenica statistički značajno odstupaju od normalne raspodjele. Statistički indikatori normalnosti te priložene raspodjele, zajedno s naznakama normalne distribucije prikazani su na slikama 4.4 do 4.17 i u tablici 4.6.



Sve raspodjele koncentracija kortizola i indeksa cirkadijalnog ritma lučenja pozitivno su asimetrične (rezultati su pomaknuti udesno) i leptokurtične (u većoj mjeri izdužene i zašiljene) dok je raspodjela alfa-amilaze pozitivno asimetrična i platikurtična (spljoštena). Ovakvi rezultati nisu neočekivani, budući je poznato postojanje izrazitih interindividualnih varijabilnosti lučenja kortizola koje se reflektiraju i na prikaz raspodjela<sup>195</sup>. Raspodjele koje značajno odstupaju od normalnosti mogu govoriti u prilog kompleksnosti regulacije cirkadijalnog ritma lučenja kortizola koji je ovisan o nizu kovarijabli, između ostalog i o polimorfizmima gena koji su uzrok različite u osjetljivosti receptora na kortizol<sup>196</sup>.

Korelacijske analize (prikazane u tablici 4.7) pokazale su statistički značajnu povezanost većine analiziranih salivarnih varijabli kortizola ( $SCC_0$ ,  $SCC_{30-45}$ ,  $SCC_{večer}$ , CAR, DCD,  $AUC_G$ ), no nije dokazana statistički značajna povezanost između koncentracije kortizola neposredno prije liježanja ( $SCC_{večer}$ ) i CAR-a, kao niti između indeksa DCD-a i  $AUC_G$ -a. Aktivnost salivarne amilaze nije bila statistički značajno povezana niti s jednom varijablom lučenja kortizola.

Rezultati ovog istraživanja djelomično se poklapaju s rezultatima drugih istraživača, poput onih dobivenih u multietničkom istraživanju ateroskleroze, kojeg su proveli Golden i suradnici (2013)<sup>197</sup>. U tom je istraživanju dokazana negativna povezanost CAR-a s koncentracijom salivarnog kortizola po buđenju ( $SCC_0$ ), ali nije dokazana njegova povezanost s ostalim mjerama diurnalnog lučenja kortizola. Povezanost CAR-a s indeksima DCD i  $AUC_G$ , koja je potvrđena u ovom istraživanju, potvrđena je djelomično i u istraživanju KORA-F3 Augsburg<sup>198</sup>. U tom je istraživanju CAR bio slabo (negativno) povezan s  $AUC_G$  i umjereno (negativno) s DCD-om. U istom je istraživanju također uočeno, jednako kao i u ovom, da CAR nije bio statistički značajno povezan s  $SCC_{večer}$ . Nadalje, Edwards i suradnici (2001) također pronalaze pozitivnu korelaciju između CAR-a i  $AUC_G$ -a. Ovakvi rezultati se, vjerojatno, mogu objasniti činjenicom da osobe koje luče više kortizola tijekom prvih 45 minuta budnosti luče i više kortizola u ostatku dana te da CAR može predstavljati mjeru koja bi mogla poslužiti kao prediktor koncentracije kortizola kroz ostatak dana.

Najveća pozitivna povezanost uočena je između koncentracije salivarnog kortizola 30 do 45 minuta nakon buđenja ( $SCC_{30-45}$ ) i  $AUC_G$ . Ovakav rezultat nije neočekivan, budući je CAR mjera izravno izvedena iz  $SCC_{30-45}$ , a povezanost CAR-a s  $AUC_G$ -om također je potvrđena. Iako je CAR mjera posebne funkcije HPAC osi, čija je regulacija odvojena od mehanizama

kontrole cirkadijalnog ritma kortizola, CAR ipak nije odvojen od ukupnog lučenja kortizola tijekom cijelog dana.

Potvrđena je pozitivna povezanost indeksa diurnalnog lučenja DCD-a s koncentracijama salivarnog kortizola po buđenju ( $SCC_0$ ) i neposredno prije lijezanja ( $SCC_{večer}$ ). Ovakav rezultat je djelomično neočekivan, s obzirom da je indeks cirkadijalnog smanjenja kortizola (DCD) ovisan o dvjema krajnjim koncentracijama ( $SCC_0$ ,  $SCC_{večer}$ ), sa  $SCC_{večer}$  u negativnoj uzročno- posljedičnoj povezanosti<sup>199</sup>. Međutim, ako se usporede koeficijenti korelacije DCD-a i ovih dviju koncentracija, može se uočiti izvrsna povezanost DCD-a sa  $SCC_0$  ( $r=0,859$ ), a slaba s  $SCC_{večer}$  ( $r=0,326$ ). Za pretpostaviti je i da bi povećanje broja prikupljenih uzoraka u priepodnevnim satima jasnije pokazalo odnose (povezanost) između ovih varijabli.

Kako je već spomenuto, povezanost aktivnosti salivarne alfa-amilaze s koncentracijama salivarnog kortizola u različitim vremenskim točkama, kao ni s indeksima cirkadijalnog ritma lučenja kortizola, nije dokazana budući da je SAA posredna mjera aktivacije neuroendokrine, a ne HPAC osi, što je sukladno i ranijim istraživanjima pa je u ispitivanjima stresa uvijek poželjno uključiti oba biljega<sup>200</sup>.

U ovom je istraživanju klsterskom analizom na ukupnom uzorku učenika s različitim obrascima buđenja i lijezanja, definirano pet klastera (tablica 4.9 i slika 4.18). To su: *noćne ptice* (najkasnije buđenje i kasno lijezanje), *spavalice* (kasno buđenje i rano lijezanje), *trnoružice* (najranije lijezanje), *ranoranioci* (najranije buđenje) i *noćobdije* (rano buđenje i kasno lijezanje).

Očekivano, učenici koji su po obrascu buđenja i lijezanja pripadali klasterima *ranoranilaca* i *noćobdija*, imali su nižu koncentraciju salivarnog kortizola po buđenju ( $SCC_0$ ), veću koncentraciju salivarnog kortizola 30 do 45 minuta nakon buđenja ( $SCC_{30-45}$ ), kao i veći CAR i  $AUC_G$  te niže cirkadijalno smanjenje kortizola (DCD), u odnosu na učenike koji su svrstani u klaster *noćnih ptica*, *spavalica* i *trnoružica*. Učenici koji su pripadali različitim klasterima, čije su značajke ranije buđenje i duže trajanje budnosti, imali su viši CAR i veći  $AUC_G$ , kao i niži cirkadijalno smanjenje kortizola, što je slično rezultatima dobivenim za učenike koji su pohađali različite turnuse nastave (tablica 4.5). Kako se sve mjere salivarnog kortizola (osim koncentracija kortizola neposredno prije lijezanja) i aktivnosti alfa-amilaze statistički značajno razlikuju za klaster *noćnih ptica*, obrasci buđenja i lijezanja mogu predstavljati prediktore cirkadijalnog lučenja salivarnog kortizola. Iako se u dostupnoj literaturi izraženije cirkadijalno smanjenje lučenja kortizola (DCD) povezuje sa zdravijim

obrascem funkcije HPAC osi, a niži CAR i manji AUC<sub>G</sub> ne, provedene analize na ovom uzorku ukazuju kako se duži san u učenika ipak može povezati sa zdravijim obrascem lučenja kortizola<sup>201</sup>.

Odgovor kortizola na buđenje definiran je kao porast koncentracija salivarnog kortizola koji je najmanje 2,5 nmol/l iznad koncentracija izmjerenih neposredno po buđenju. Ovaj kriterij definirali su Weitzmanu i suradnicima još 1971. godine, kad su uočili kako se povećanje od barem 55,2 nmol/l ukupnog kortizola u plazmi može smatrati sekretornom epizodom<sup>202</sup>. Kako se u uzorku sline nalazi približno 5 % koncentracije kortizola koje se pronalaze i u plazmi, tako je kriterij povećanja od 2,5 nmol/l u odnosu na bazalnu vrijednost uzet kao strogi i definirani kriterij. Stoga se u većini istraživanja ispitanici mogu podijeliti u dvije skupine: oni koji imaju negativan CAR ili CAR < 2,5 nmol/l tj. nemaju adekvatan odgovor kortizola na buđenje (engl. *non responders*), dok osobe s CAR-om > 2,5 nmol/l (engl. *responders*) pokazuju adekvatan odgovor, odnosno imaju porast koncentracija kortizola nakon buđenja. U istraživanju CAR-a u odraslih, 76,8 % ispitanika imalo je odgovor koji se može smatrati adekvatnim<sup>61</sup>. U navedenom istraživanju, svi su se ispitanici budili rano (između 4 i 5 sati) i uz prisilno buđenje s alarmom, što je zasigurno povećalo broj ispitanika koji su imali adekvatan odgovor. U ovom istraživanju adekvatan odgovor na buđenje imalo je 56,1 % učenika (tablica 4.10). Skupini tzv. *respondera* u većem su broju pripadale učenice (58,9 %), učenici koji pohađaju prijedpodnevi turnus (63 %) te učenici koji su po obrascu buđenja i lijeganja svrstani u klastere *ranoranioca* i *noćobdija* (70,4 i 76,3 %). Ovakvi rezultati su očekivani, ponajprije što su u skladu s prethodno potkrijepljenom pretpostavkom o vremenu buđenja i trajanju spavanja kao prediktora CAR-a. Također, u studiji KORA-F3 Augsburg, provedenoj na odraslim ispitanicima 2010. godine, potvrđeno je 25,3 % *non respondera*<sup>200</sup>, a u istraživanju djece iz 2011. godine njih 47,5 %<sup>203</sup>, što je slično i rezultatima ovog istraživanja (56,1 %).

Dosadašnja istraživanja aktivnosti HPAC osi u adolescenskoj dobi ne daju jednoznačne odgovore na pitanje koji su to temeljni alostatski procesi kojima se aktivno održava stabilnost pojedinca unutar stalnih promjena okoliša<sup>204</sup>. Naime, u većini istraživanja dobiveni rezultati su tumačeni u kontekstu nižeg ili višeg odgovora kortizola na buđenje (CAR), nižeg ili izraženijeg smanjenja diurnalne, cirkadijalne krivulje kortizola (DCD) te manje ili veće površine ispod krivulje (AUC<sub>G</sub>), usporedbom rezultata između ispitanika ili u istih ispitanika unutar nekog vremenskog intervala. Stoga je veliki izazov pokušati odrediti rane naznake patoloških promjena u funkciji HPAC osi, posebice kada se uzme u obzir činjenica da nisu

precizno određeni rasponi koncentracije kortizola i indeksa lučenja kortizola koje se mogu očekivati u fizološkoj, adaptacijskoj funkciji tijekom adolescencije. Dodatni izazov interpretaciji patoloških promjena proizlazi iz činjenice da promjena u funkciji HPAC osi ovisi o psihološkom profilu i situaciji u kojoj se osoba nalazi. Sagledavajući ove činjenice, jedan od ciljeva ovog istraživanja bio je pokušati definirati intervale koncentracija salivarnog kortizola i indeksa cirkadijalnog ritma njegovog lučenja, kao i aktivnosti alfa-amilaze u učenika završnih razreda srednjih škola u Hrvatskoj. Koncentraciju salivarnog kortizola u tri vremenske točke za izradu referentnih intervala izmjerili smo imunokemijskom metodom (ELISA, od engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*), na uzorku od 903 učenika. Referentni intervali izračunati su neparametrijskim metodama, uz raspodjelu uzorka prema spolu (tablica 4.11). Donedavno, u dostupnoj literaturi nije bilo objavljenih referentnih vrijednosti salivarnog kortizola izvedenih iz analiza provedenih na velikom broju ispitanika različite dobi. No, krajem 2016. godine objavljeno je opsežno istraživanje Millera i suradnika u kojem je provedena na meta-analiza 15 studija<sup>205</sup>. Navedenim istraživanjem, koje je obuhvatilo više od 18000 ispitanika, definirani su referentni intervali, a koncentracije kortizola izmjerene su dvjema imunokemijskim metodama, DELFIA-om (engl. *dissociation enhancement lanthanide fluoroimmunoassay*) i kemiluminiscentnom imunokemijskom metodom. Kako bi dobili usporedivost i sljedivost rezultata prema rezultatima dobivenim metodom tekućinske kromatografije s tandemskom masenom spektrometrijom (LC/MS-MS), istraživači su matematički preračunali koncentracije kortizola iz svih 15 studija. No, objavljeni referentni intervali mogu biti samo djelomično korisni pa se koncentracije kortizola mjerene imunokemijskim metodama moraju prilagoditi kako bi bile usporedive s objavljenim referentnim intervalom, što je jasno nakon usporedbe referentnih intervala dobivenih meta-analizom u CIRCORT istraživanju s referentnim intervalima dobivenim u ovom istraživanju. Naime, u spomenutom istraživanju nisu obuhvaćene mjere koje bi se odnosile na vrijeme od buđenja do jedan sat nakon buđenja, a nedostaju i intervali indeksa cirkadijalnog ritma. Jedina mjera koja bi se mogla usporediti bili bi intervali koncentracija kortizola neposredno prije lijeganja i koncentracija kortizola u 16. satu budnosti iz CIRCORT istraživanja, ali se i oni moraju uzeti s određenom rezervom budući su dobiveni za ispitanike u dobi od 11-20 godina.

Neosporna je činjenica kako je metoda masene spektrometrije postala metoda izbora za mjerenje koncentracija steroidnih hormona, kao i kortizola, obzirom na poznata djelomična ograničenja imunokemijskih metoda (križna reaktivnost, prozonski efekt, utjecaj matriksa i heterofilnih protutijela, niska osjetljivost i specifičnost zbog niskog afiniteta anti-steroidnih

protutijela) i nesljedivost rezultata zbog nepostojanja standardizacije metoda, što je posljedica upotrebe različitih protutijela i dizajna samih metoda različitih proizvođača<sup>206</sup>. Međutim, unatoč brojnim prednostima (manja križna reaktivnost) mala je vjerojatnost da će masena spektrometrija u skoroj budućnosti istisnuti imunokemijske metode, ponajprije zbog njihovih dokazanih prednosti u rutinskom radu (visoki kapacitet i brzina, jednostavna tehnička izvedba, dostupnost automatiziranih platformi, uz prihvatljive cijene), ali i zbog činjenice da se kliničari u interpretaciji nalaza koncentracija hormona više oslanjaju na imunokemijske metode, s kojima imaju više iskustva. Zbog svega iznesenog, referentne vrijednosti koncentracija salivarnog kortizola u tri vremenske točke tijekom dana i aktivnosti alfa-amilaze mjerene imunokemijskom ELISA metodom imaju veliku važnost u rutinskoj kliničkoj praksi, ali i u budućim populacijskim istraživanjima.

U ovom istraživanju ispitana je subjektivna procjena stresa učenika po pojedinim životnim domenama, kao i načini suočavanja te njihova povezanost s mjerama cirkadijalnog ritma lučenja kortizola te alfa-amilazom, kroz suočavanje sa svakodnevnim događajima i manjim stresorima. I učenici i učenice ocijenili su budućnosti kao najstresniju domenu, izrazili zabrinutost zbog budućih odluka, posebice onih povezanih s izborom zanimanja (tablica 4.12). Također, među dijelom učenika koji žele nastaviti školovanje, postoji zabrinutost hoće li se uspjeti dobro pripremiti za državnu maturu i upisati željeni fakultet, dok je dio učenika koji ulazi na tržište rada nesiguran zbog mogućnosti zaposlenja. Druga domena života koju su učenici procijenili kao stresnu je zabrinutost zbog uspjeha u školi te teškoća u odnosima s vršnjacima i roditeljima. Rezultati ovog istraživanja u skladu su s rezultatima istraživanja učenika iz sedam europskih zemalja<sup>207</sup> i rezultatima istraživanja učenika iz sedamnaest zemalja koje je provela Inge Seiffge-Krenke sa suradnicima 2012. godine, a u kojima je potvrđeno da su učenici najviše zabrinuti zbog nesigurnosti vezane uz nastavak obrazovanja i ulazak na tržište rada<sup>208</sup>.

Zabrinutost mladih koji ulaze na tržište rada sasvim je opravdana. Naime, Hrvatska je treća zemlja Europske unije, iza Grčke i Španjolske, po nezaposlenosti mladih po podacima Eurostata iz 2015. godine<sup>209</sup>.

Nadalje, u ovom su istraživanju potvrđene statistički značajne razlike u procjeni stresa između spolova. Učenice većinu životnih domena doživljavaju više stresno, s iznimkom stresa vezanog uz partnera koji oba spola doživljavaju jednako stresno. To je, također, sukladno istraživanju Seiffge-Krenke i suradnika iz 2009. godine<sup>210</sup>. Takvi rezultati mogu se

dovesti u vezu s činjenicom kako su adolescentice u fizičkom razvoju otprilike dvije godine naprednije od adolescenata iste dobi pa prije svojih muških vršnjaka završavaju proces odrastanja i sazrijevanja te imaju manje vremena za postizanje zadanih ciljeva<sup>210</sup>.

Razlike prema spolu su utvrđene i u načinu suočavanja, a i u povezanosti percepcije, suočavanja i koncentracija salivarnog kortizola (tablice 4.13 – 4.17). U učenika nije bilo korelacija između većine od navedenih mjera (izuzev CAR-a i stresa vezanog uz budućnost), dok je u učenika slaba korelacija pronađena između procjene stresa vezanog za budućnost i koncentracije salivarnog kortizola 30 do 45 minuta nakon buđenja kao i stresa koji je vezan za školu i cirkadijalnog smanjenja kortizola. Slaba povezanost uočena je i između različitih načina suočavanja s koncentracijom salivarnog kortizola neposredno prije lijeganja i indeksom CAR u učenika. Temeljem testa samoprocjene stresa i strategija suočavanja sa stresom, a prema validiranim, prevedenim i kulturno prilagođenim instrumentima (PQ i CASQ) uočavaju se tri načina suočavanja sa stresom u učenika: aktivno i unutarnje suočavanje te povlačenje<sup>211</sup>. Aktivno suočavanje uključuje traženje socijalne potpore različitim načinima, kao što su razgovor o problemima s roditeljima, drugim odraslim osobama, vršnjacima ili traženje pomoći kroz različite institucije. Unutarnje suočavanje uključuje strategije kognitivne procjene kao što su procjena situacije i traženje potencijalnih rješenja te razmatranje mogućih kompromisa. Povlačenje je način suočavanja koji se povezuje s emocionalnim uzmakom, odvrćanjem pažnje i uzmicanjem. Vrlo često se povlačenje povezuje sa zlouporabom alkohola ili sredstava ovisnosti. Od ova tri načina suočavanja, u ovom istraživanju učenici su najčešće koristili aktivan način suočavanja nakon čega slijedi unutarnje suočavanje, dok je povlačenje najmanje često. Učenice češće koriste aktivno suočavanje u odnosu na učenike, a jednako tako i prijavljuju više razine ukupnog stresa. Učenici jednako često koriste aktivno i unutarnje suočavanje, dok najmanje koriste povlačenje kao način suočavanja. Rezultati analize načina suočavanja sa stresom, kao i subjektivne procjene stresa po domenama života, u skladu su s rezultatima istraživanja učenika iz sedam europskih zemalja koje su proveli Gelhard i suradnici 2007. godine<sup>209</sup>.

U dostupnoj literaturi relativno je mali broj objavljenih istraživanja povezanosti varijabli lučenja kortizola s genskim biljezima u uzorku adolescenata<sup>212</sup>, a većina je istraživanja provedena na populacijama odraslih<sup>213,214,215,216</sup>.

U ovom je istraživanju analizirana genska podloga interindividualnih razlika u odgovoru HPAC osi na stres pomoću polimorfizama jednog nukleotida (SNP). Na temelju podataka iz

literature za analizu su odabrani polimorfizam rs5522 u genu za mineralokortikoidni receptor (*NR3C2*), dvojni polimorfizam rs6189 i rs6190 u genu *ER22/23EK* (*NR3C1*) za glukokortikoidni receptor te rs1360780 u genu za FK506 vezujući protein 5 (*FKBP5*), kao najčešće istraživani polimorfizmi u analizi HPAC osi. Navedeni polimorfizmi su testirani na 400 ispitanika, nasumično izabranih iz ukupnog uzorka od 903 učenika, s podjednakim brojem učenika i učenica. Upravo zbog nasumičnog izbora ispitanika za genske analize, manjem broju izabranih ispitanika nije bilo moguće izračunati sva tri indeksa cirkadijalnog ritma stoga što nisu naveli podatak o vremenu uzorkovanja.

Nakon provedene genotipizacije, određena je učestalost alela i genotipova i napravljena je analiza pokoravanja Hardy-Weinbergovom zakonu ravnoteže, u ukupnom uzorku ispitanika i u odvojenim poduzorcima učenika i učenica iz četiri najveća hrvatska grada. Iako su primjećena odstupanja od HWE-a u poduzorcima učenika i učenica, u ukupnom uzorku nisu primjećena nikakva odstupanja od HWE-a, osim za polimorfizam rs1360780 ( $P=0,017$ ), no za pretpostaviti je kako bi dodatnim povećanjem broja ispitanika ta razlika nestala.

Također, napravljena je i analiza povezanosti fenotipskih varijabli (koncentracije i indeksi cirkadijalnog ritma lučenja kortizola) s pojedinim SNP-ovima.

U nekoliko istraživanja je pokazano kako nositelji alela G za rs5522 mogu biti osjetljivi na različite stresne životne događaje te imaju povećavan rizik za razvoj depresije, deficita pažnje i kognitivnog deficita<sup>126,127,217</sup>. Međutim, u ovom su istraživanju pronađene statistički značajne razlike povezanosti alela G s višom koncentracijom kortizola po buđenju ( $P=0,036$ ), nižim CAR-om ( $P=0,021$ ), dok je povezanost s DCD-om bila granična ( $P=0,050$ ). Za ostale varijable i polimorfizme nisu uočene nikakve razlike. Izraženije cirkadijalno smanjenje lučenja kortizola (DCD) uglavnom se povezuje sa zdravijim obrascem funkcije HPAC osi, za razliku od nižeg CAR-a. Moguće je da se dobivene razlike mogu pripisati činjenici da su u spomenutim istraživanjima testirani odrasli ispitanici koji su imali poremećaje pažnje ili jedenja, za razliku od zdravih adolescenata ispitivanih u ovom istraživanju. Također se može nagađati kako učenici s dokazanim alelom G imaju niži CAR te stoga pokazuju lošiju pripremljenost za stresne izazove u nadolazećem danu, unatoč nešto izraženijim vrijednostima DCD-a.

Nešto drugačiji rezultati dobiveni su u velikom TRIALS istraživanju, provedenom na 553 ispitanika, u dobi od 15-17 godina. U tom je istraživanju ispitivana povezanost SNP-ova rs5522 i rs6190 s koncentracijama kortizola i srčanog ritma u odgovoru na socijalne stresne

poticaje te nisu pronađene razlike, a koje su u prethodnim istraživanjima potvrđene u odraslih ispitanika<sup>218,128</sup>.

U ranijim istraživanjima potvrđeno je kako ne postoji povezanost dvojnog polimorfizma rs6189/rs6190 s osjetljivošću na glukokortikoide<sup>219</sup>, no u novijim istraživanjima potvrđena je povezanost ovog polimorfizma s povećanim rizikom za nastanak velikih depresivnih tegoba, kao i metaboličkog sindroma, ali samo u mlađih muškaraca i manje obrazovanih ispitanika, što upućuje na moguće interakcije okolišnih čimbenika i gena<sup>220</sup>.

Zanimljivo, analizom povezanosti genotipova pojedinog polimorfizma s varijablama lučenja kortizola, analiziranih pomoću softwera PLINK v1.07, u ispitivanom uzorku učenika nije potvrđena povezanost ovih polimorfizama niti s jednom varijablom kortizola, osim za CAR i rs6190 ( $P=0,019$ ), dok analizom Mann-Whitneyevim testom te razlike nisu pronađene, niti u cjelokupnom uzorku ispitanika niti u poduzorcima učenika i učenica.

Treći ispitivani polimorfizam rs1360780 (C/T) je jedini među FKBP5 polimorfizmima za koji je dokazan funkcionalni učinak<sup>221</sup>. Čini se kako je protein FKBP5 uključen u patogenezu bolesti povezanih sa stresom, a neka su istraživanja pokazala povezanost genotipova FKBP5 s rizikom od nastanka post-traumatskog stresnog poremećaja i depresije u traumatiziranih osoba, ali i ADHD-a u predškolske djece<sup>222</sup>. Istraživanje Isakssona i suradnika iz 2015.g. potvrdilo je prethodne rezultate o povezanosti polimorfizma gena *FKBP5* s ADHD-om i niskim koncentracijama kortizola<sup>223</sup>.

Međutim, unatoč početnim pretpostavkama o mogućoj povezanosti FKBP5 s funkcionalnim učinkom, u ovom istraživanju nije pokazana statistički značajna povezanost indeksa cirkadijalnog ritma lučenja kortizola s bilo kojim alelom ili genotipom ovog polimorfizma, analizirana pomoću dvaju statističkih programa.

U istraživanju Bortoluzzija i suradnika (2015) nije dokazana povezanost između anksioznog poremećaja u adolescenata i niza polimorfizama gena HPAC osi. Prilikom odabira ispitivanih polimorfizama u navedenom istraživanju definirane su jasne metodološke smjernice, no unatoč tome nije potvrđena povezanost između genskih varijanti i pojavnosti ovog poremećaja u adolescenata<sup>214</sup>.

Brižljivim pregledom dostupnih rezultata iz literature, odabrani su polimorfizmi koji utječu na aktivnost HPAC osi, kao dio genskog profila koji određuje individualni odgovor na stres te načine suočavanja sa stresom, a koji utječu na nastanak bolesti povezanih sa



stresom. Unatoč tome, u ovom istraživanju su pronađene statistički značajne razlike povezanosti pojedinih polimorfizama jednog nukleotida (rs5522 i rs6190) i odgovora kortizola na buđenje, dok za ostale ispitivane varijable kortizola statistički značajne razlike nisu utvrđene. Stoga smatramo da bi u buduća istraživanja trebalo uvrstiti i analizu dvaju spomenutih polimorfizama kao mogućih genskih biljega interindividualnih razlika u odgovoru kortizola na buđenje.

Uz to, u budućim istraživanjima bilo bi dobro povećati broj uzoraka sline tijekom dana kao i povećati broj dana uzorkovanja. Nadalje, za pretpostaviti je kako bi dodatno povećanje broja ispitanika uključenih u istraživanje, kao i većeg broja polimorfizama, uz primjenu najnovijih tehnologija sekvenciranja novije generacije (genom i transkriptom), značajno doprinijelo stvaranju jasnije slike o povezanosti gena i odgovora HPAC osi na stres.

Isto tako bi uključivanje dodatnih fenotipskih kovarijabli lučenja kortizola zasigurno i produbilo saznanja o povezanosti HPAC osi s genomom te o njihovim interakcijama s okolišnim čimbenicima.

## 6 ZAKLJUČCI

1. Potvrđene su statistički značajne razlike koncentracija salivarnog kortizola odmah po buđenju ( $SCC_0$ ) i 30-45 minuta nakon buđenja ( $SCC_{30-45}$ ), ali ne i u koncentraciji kortizola neposredno prije lijeganja ( $SCC_{večer}$ ) u uzorku učenika i učenica. Potvrđene su i statistički značajne razlike indeksa cirkadijalnog ritma lučenja salivarnog kortizola ( $CAR$ ,  $DCD$  i  $AUC_G$ ) i aktivnosti salivarne alfa-amilaze ( $sAA$ ) prema spolu.
2. Statistički značajne razlike pronađene su u povezanosti turnusa nastave s koncentracijom salivarnog kortizola mjerenog 30-45 minuta nakon buđenja, ali ne i s koncentracijama u druge dvije vremenske točke. Statistički značajne razlike potvrđene su za sva tri indeksa cirkadijalnog ritma lučenja salivarnog kortizola u učenika koji su pohađali različite turnuse i imali različite obrasce buđenja i lijeganja (prije- vs. poslijepodnevni turnus), ali ne i za aktivnosti salivarne alfa-amilaze.
3. Nisu potvrđene statistički značajne razlike niti jedne ispitivane varijable u učenika koji pohađaju različite tipove škola (gimnazije vs. strukovne škole).
4. Analizom stresa po domenama života uočene su statistički značajne razlike u poimanju većine domena kao stresnih između učenika i učenica. Analiza je pokazala da se učenici i učenice razlikuju po načinu suočavanja sa stresom. Učenice učestalije koriste aktivno suočavanje sa stresom u odnosu na učenike.
5. Korelacijska analiza je pokazala da ne postoji statistički značajna povezanost doživljaja stresa u većini domena života te načina suočavanja sa stresom s analiziranim salivarnim varijablama u učenika i učenica.

6. Utvrđeni su referentni intervali koncentracija salivarnog kortizola, indeksa cirkadijalnog ritma lučenja i aktivnosti salivarne alfa-amilaze u uzorku učenika i učenica.
7. Nisu uočene statistički značajne razlike u povezanosti koncentracija salivarnog kortizola i indeksa cirkadijalnog ritma lučenja (fenotipskih varijabli) s genotipovima istraživanih polimorfizama, niti u ukupnom uzorku ispitanika niti u odvojenim poduzorcima učenika i učenika, osim za kortizol po buđenju i CAR s polimorfizmom rs 5522 te za CAR s polimorfizmom rs6190 u cjelokupnom uzorku.
8. Rezultati ovog istraživanja potvrđuju kako analize koncentracija salivarnog kortizola i indeksa diurnalnog ritma lučenja mogu biti korisni instrumenti za ispitivanje stresa u nekliničkoj i u kliničkoj populaciji. Ipak, uključivanje još većeg broja ispitanika, uzoraka uzetih tijekom više dana i/ili u više vremenskih točaka, većeg broja genskih polimorfizama te dodatnih fenotipskih kovarijabli lučenja kortizola zasigurno bi dalo jasniju sliku o interakcijama HPAC osi s okolišnim i epigenetičkim utjecajima.

## 7 LITERATURA

- 
- <sup>1</sup> Ryan R, Booth S, Spathis A, Mollart S, Clow A (2016) Use of Salivary Diurnal Cortisol as an Outcome Measure in Randomised Controlled Trials: a Systematic Review. *Ann behav med* 50:210–236
- <sup>2</sup> Steinberg L (2007) Risk taking in adolescence new perspectives from brain and behavioral science. *Curr Dir Psychol Sci* 16:55–9
- <sup>3</sup> Munsey C (2006) Emerging adults: The in-between age. *Monitor on Psychology* 37(6):68
- <sup>4</sup> Dahl RE (2004) Adolescent brain development: A period of vulnerabilities and opportunities. Keynote address. *Ann N Y Acad Sci* 1021:1–22
- <sup>5</sup> Gelhaar T, Seiffge-Krenke I, Borge A, Cicognani E, Cunha M, Lončarić D, Macek P, Steinhausen HC; Winkler Metzhe C (2007) Adolescent coping with everyday stressors: A seven-nation study of youth from central, eastern, southern, and northern Europe. *European Journal of Developmental Psychology* 4(2):129–56
- <sup>6</sup> Kelley AE, Schochet T, Landry CF (2004) Risk taking and novelty seeking in adolescence: introduction to part I. *Ann N Y Acad Sci* 1021:27–32
- <sup>7</sup> Kelley TM (2004) Positive psychology and adolescent mental health: false promise or true breakthrough? *Adolescence* 39(154):257–78
- <sup>8</sup> Cannon WB (1929) Bodily Changes in Pain, Hunger, Fear and Rage: An Account of Recent Researches Into the Function of Emotional Excitement. 1. izd. New York: Appleton
- <sup>9</sup> Cannon WB (1932) The Wisdom of the Body. 1. izd. New York: W.W. Norton & Company, Inc
- <sup>10</sup> Selye H (1956) The Stress of Life. 1. izd. McGraw-Hill
- <sup>11</sup> Lazarus RS (1966) Psychological stress and the coping process, New York: izd. McGraw-Hill
- <sup>12</sup> Folkman S, Lazarus RS (1984) Stress, appraisal, and coping, New York: Springer Pub. Co
- <sup>13</sup> Harvey A, Nathens AB, Bandiera G, Leblanc VR (2010) Threat and challenge: cognitive appraisal and stress responses in simulated trauma resuscitations. *Med Educ* 44(6): 587–94
- <sup>14</sup> Sterling P, Eyer J (1988). Allostasis: A new paradigm to explain arousal pathology. In Fisher S, Reason J. *Handbook of life stress, cognition, and health*. Chicester, NY: Wiley.
- <sup>15</sup> McEwen BS (1998) Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. *Ann N Y Acad Sci* 1:840: 33–44
- <sup>16</sup> McEwen BS, Stellar E (1993) Stress and the individual. Mechanisms leading to disease. *Arch Intern Med* 153(18):2093–101
- <sup>17</sup> Granger DA, Fortunato CK, Beltzer EK, Virag M, Bright MA, Out D (2012) Focus on Methodology: Salivary bioscience and research on adolescence: An integrated perspective. *Journal of Adolescence* 35:1081–1095
- <sup>18</sup> Elliott GR, Eisdorfer C (1982) *Stress and Human Health: Analysis and Implications of Research* izd. Springer Pub Co
- <sup>19</sup> McEwen BS (1998) Protective and damaging effects of stress mediators. *N Engl J Med* 338:171–9
- <sup>20</sup> Valentino RJ, Van Bockstaele E (2008) Convergent regulation of locus coeruleus activity as an adaptive response to stress. *Eur J Pharmacol* 583:194–203

- <sup>21</sup> Chrousos GP, Gold PW (1992) The concepts of stress and stress system disorders: Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA* 267(9): 1244-52. Erratum in *JAMA* 268(2):200
- <sup>22</sup> Granger DA, Kivlighan KT, El-Sheikh M, Gordis E, Stroud LR (2007) Salivary alpha-amylase in biobehavioral research: Recent developments and applications. *Ann N Y Acad Sci* 1098:122-44
- <sup>23</sup> Kirschbaum C, Read GF, Hellhammer DH (1994) Assessment of hormones and drugs in saliva in biobehavioral research. Göttingen: Hogrefe & Huber
- <sup>24</sup> Tonsfeldt KJ, Chappell PE (2012) Clocks on top: The role of the circadian clock in the hypothalamic and pituitary regulation of endocrine physiology. *Mol Cell Endocrinol* 349(1)
- <sup>25</sup> Moisan MP (2012) CBG: a cortisol reservoir rather than a transporter. *Nature Reviews Endocrinology* 9.2:78
- <sup>26</sup> Kudielka BM, Buske-Kirschbaum A, Hellhammer DH, Kirschbaum C (2004) HPA axis responses to laboratory psychosocial stress in healthy elderly adults, younger adults, and children: impact of age and gender. *Psychoneuroendocrinology* 29:83-98
- <sup>27</sup> Kumari M, Shipley M, Stafford M, Kivimäki M (2011) Association of Diurnal Patterns in Salivary Cortisol with All-Cause and Cardiovascular Mortality: Findings from the Whitehall II Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 96(5): 1478-1485
- <sup>28</sup> Rhen T, Cidlowski JA (2005) Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med* 353:1711-23
- <sup>29</sup> Qian X, Droste SK, Lightman SL, Reul JMHM, Linthorst ACE (2012) Circadian and Ultradian Rhythms of Free Glucocorticoid Hormone Are Highly Synchronized between the Blood, the Subcutaneous Tissue and the Brain. *Endocrinology* 153(9):4346-4353
- <sup>30</sup> Walker JJ, Terry JR, Lightman SL (2009) Origin of ultradian pulsatility in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences*
- <sup>31</sup> Bierwolf C, Struve K, Marshall L, Born J, Fehm HL (1997) Slow wave sleep drives inhibition of pituitary-adrenal secretion in humans. *J Neuroendocrinol*;9(6):479-84
- <sup>32</sup> Moore RY, Eichler VB (1972) Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res*;42(1):201-6
- <sup>33</sup> Green DJ, Gillette R (1982) Circadian rhythm of firing rate recorded from single cells in the rat suprachiasmatic brain slice. *Brain Res* 245(1):198-200
- <sup>34</sup> Dickmeis T (2009) Glucocorticoids and the circadian clock. *J Endocrinol*;200(1):3-22
- <sup>35</sup> Stone AA, Schwartz JE, Smyth J, Kirschbaum C, Cohen S, Hellhammer D, Grossman S (2001) Individual differences in the diurnal cycle of salivary free cortisol: a replication of flattened cycles for some individuals. *Psychoneuroendocrinology* 26:295-306
- <sup>36</sup> Adam EK, Kumari M (2009) Assessing salivary cortisol in large-scale, epidemiological research. *Psychoneuroendocrinology* 34:1423-1436
- <sup>37</sup> Van de Kar LD, Blair ML (1999) Forebrain Pathways Mediating Stress-Induced Hormone Secretion. *Front Neuroendocrinol* 20:1-48
- <sup>38</sup> Adam EK (2006) Transactions among adolescent trait and state emotion and diurnal and momentary cortisol activity in naturalistic settings. *Psychoneuroendocrinology* 31(5):664-79
- <sup>39</sup> Grossi G, Perski A, Ekstedt M, Johansson J, Lindström M, Holm K (2005) The morning salivary cortisol response in burnout. *J Psychosom Res.* 59:103-111
- <sup>40</sup> Clow A, Hucklebridge F, Stalder T, Evans P, Thorn L (2010) The cortisol awakening response: More than a measure of HPA axis function. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 35:97-103
- <sup>41</sup> Clow A, Thorn L, Evans P, Hucklebridge F (2004) The awakening cortisol response: methodological issues and significance. *Stress: The International Journal on the Biology of Stress.* 7(1):29-37
- <sup>42</sup> Wu'st S, Federenko I, Hellhammer DH, Kirschbaum C (2000a) Genetic factors, perceived chronic stress, and the free cortisol response. *Psychoneuroendocrinology* 25:707-720
- <sup>43</sup> Kunz-Ebrecht SR, Kirschbaum C, Marmot M, Steptoe A (2004) Differences in cortisol awakening response on work days and weekends in women and men from the Whitehall II cohort. *Psychoneuroendocrinology*, 29(4):516-528
- <sup>44</sup> Williams E, Magid K, Steptoe A (2005) The impact of time of waking and concurrent subjective stress on the cortisol response to awakening. *Psychoneuroendocrinology* 30(2):139-148
- <sup>45</sup> Mikolajczak M, Quoidbach J, Vanooteghem V, Lambert F, Lahaye M, Fille'e C, de Timary P (2010) Cortisol awakening response (CAR)'s flexibility leads to larger and more consistent associations with psychological factors than CAR magnitude. *Psychoneuroendocrinology* 35:752-7
- <sup>46</sup> Law R, Hucklebridge F, Thorn L, Evans P, Clow A (2013) State variation in the cortisol awakening response. *Stress* 16(5):483-492
- <sup>47</sup> Dominik SS, Visser-Meily JMA, Oort FJ, Meijer AM (2012) The diurnal salivary cortisol pattern of adolescents from families with single, ill and healthy parents. *Journal of Psychosomatic Research* 72:288-292

- <sup>48</sup> Mattsson C, Reynolds RM, Simonyte K, Olsson T, Walker BR (2009) Combined receptor antagonist stimulation of the HPA axis test identifies impaired negative feedback sensitivity to cortisol in obese men. *J Clin Endocrinol Metab* 94:1347–52
- <sup>49</sup> Gunnar MR, Vazquez DM (2001) Low cortisol and a flattening of expected daytime rhythm: potential indices of risk in human development. *Dev Psychopathol* 13:515–38
- <sup>50</sup> Hackett RA, Steptoe A, Kumari M (2014) Association of Diurnal Patterns in Salivary Cortisol With Type 2 Diabetes in the Whitehall II Study. *J Clin Endocrinol Metab* 99(12):4625–4631
- <sup>51</sup> Kumari M, Shipley M, Stafford M, Kivimaki M (2011) Association of diurnal patterns in salivary cortisol with all-cause and cardiovascular mortality: findings from the Whitehall II study. *J Clin Endocrinol Metab* 96:1478–85
- <sup>52</sup> de Kloet ER, Joëls M, Holsboer F (2005) Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* 6(6):463–75
- <sup>53</sup> Sephton SE, Sapolsky RM, Kraemer HC, Spiegel D (2000) Diurnal cortisol rhythm as a predictor of breast cancer survival. *J Natl Cancer Inst* 92(12):994–1000
- <sup>54</sup> Sephton SE, Lush E, Dedert EA, Floyd AR, Rebholz WN, Dhabhar FS, Spiegel D, Salmon P (2013) Diurnal cortisol rhythm as a predictor of lung cancer survival. *Brain Behav Immun* 30 Suppl:S163–70
- <sup>55</sup> Saridjana NS, Veldersa FP, Jaddoea VWV, Hofman A, Verhulst FC, Tiemeier H (2014) The longitudinal association of the diurnal cortisol rhythm with internalizing and externalizing problems in pre-schoolers. The Generation R Study. *Psychoneuroendocrinology* 50:118–129
- <sup>56</sup> Pruessner JC, Kirschbaum C, Meinlschmid G, Hellhammer DH (2003) Two formulas for computation of the area under the curve represent measures of total hormone concentration versus time-dependent change. *Psychoneuroendocrinology* 28:916–31
- <sup>57</sup> Slopen N, McLaughlin KA, Shonkoff JP (2014) Interventions to Improve Cortisol Regulation in Children: A Systematic Review. *Pediatrics* 133(2):312–326
- <sup>58</sup> Nieman LK, Biller BMK, Findling JW, Newell-Price J, Savage MO, Stewart PM, Montori VM (2008) The Diagnosis of Cushing's Syndrome: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 93(5):1526–1540
- <sup>59</sup> Hill Golden S, Sánchez BN, Wu M, Champaneri S, Diez Roux AV, Seeman T, Wand GS (2013) Relationship between the cortisol awakening response and other features of the diurnal cortisol rhythm: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Psychoneuroendocrinology* 38(11):2720–8
- <sup>60</sup> Stalder T, Hucklebridge F, Evans P, Clow A (2009) Use of a single case study design to examine state variation in the cortisol awakening response: relationship with time of awakening. *Psychoneuroendocrinology* 34(4):607–614
- <sup>61</sup> Wust S, Wolf J, Hellhammer DH, Federenko I, Schommer N, Kirschbaum C (2002) The cortisol awakening response – normal values and confounds. *Noise Health*.2(7):79–88
- <sup>62</sup> Rosmalen JG, Oldehinkel AJ, Ormel J, de Winter AF, Buitelaar JK, Verhulst FC (2005) Determinants of salivary cortisol levels in 10–12 year old children; a population-based study of individual differences. *Psychoneuroendocrinology* 30(5):483–95
- <sup>63</sup> Edwards S, Evans P, Hucklebridge F, Clow A (2001) Association between time of awakening and diurnal cortisol secretory activity. *Psychoneuroendocrinology*.26(6):613–622
- <sup>64</sup> Maina G, Palmas A, Bovenzi M, Filon FL (2009) Salivary Cortisol and Psychosocial Hazards at Work. *American Journal of Industrial Medicine* 52:251–260
- <sup>65</sup> Vidovic M, Hisheh S, Schmitt L (2007) Cortisol and testosterone levels on a weekend and a work day in three mountain villages in the Selska Valley of northwest Slovenia. *Ann. Hum. Biol.* 34 (1):26–33
- <sup>66</sup> Schlotz W, Hellhammer J, Schulz P, Stone AA (2004) Perceived work overload and chronic worrying predict weekend-weekday differences in the cortisol awakening response. *Psychosom Med.* 66(2):207–214
- <sup>67</sup> Tornhage CJ (2002) Reference values for morning salivary cortisol concentrations in healthy school-aged children. *J Pediatr Endocrinol Metab*.15(2):197–204
- <sup>68</sup> Ricciardolo FLM (2007) The treatment of asthma in children: inhaled corticosteroids. *Pulmon. Pharmacol. Ther.*20:473–482
- <sup>69</sup> Rosmond R, Holm G, Bjorntorp P (2000) Food-induced cortisol secretion in relation to anthropometric, metabolic and haemodynamic variables in men. *Int. J. Obesity Relat. Metab. Disord.* 24(4):416–422
- <sup>70</sup> Lovallo WR, Whitsett TL, Al-Absi M, Sung BH, Vincent AS, Wilson MF (2005) Caffeine stimulation of cortisol secretion across the waking hours in relation to caffeine intake levels. *Psychosom. Med.* 67:734–739
- <sup>71</sup> Steptoe A, Ussher M (2006) Smoking, cortisol and nicotine. *Int. J. Psychophysiol.* 59:228–235
- <sup>72</sup> Matchock RL, Dorn LD, Susman EJ (2007) Diurnal and seasonal cortisol, testosterone, and DHEA rhythms in boys and girls during puberty. *Chronobiol Int.* 24(5):969–990
- <sup>73</sup> Filaire E, Bernain X, Sagnot M, Lac G (2001) Preliminary results of mood state, salivary testosterone:cortisol ratio and team performance in a professional soccer team. *Eur. J. Appl. Physiol.* 86(2):179–184

- <sup>74</sup> Badrick E, Kirschbaum C, Kumari M (2007) The relationship between smoking status and cortisol secretion. *J Clin Endocrinol Metab.* 92(3):819–824
- <sup>75</sup> Steptoe A, Cropley M, Griffith J, Kirschbaum C (2000) Job strain and anger expression predict early morning elevations in salivary cortisol. *Psychosom. Med.* 62:286–292
- <sup>76</sup> Strickland PL, Deakin JFW, Percival C, Dixon J, Gater R, Goldberg DP (2002) Bio-social origins of depression in the community. *Br. J. Psychiatr.* 180:168–173
- <sup>77</sup> Goodyer IM, Herbert J, Altham PM (1998) Adrenal steroid secretion and major depression in 8- to 16-year-olds. III: Influence of cortisol/DHEA ratio at presentation on subsequent rates of disappointing life events and persistent major depression. *Psychol. Med.* 28(2):265–273
- <sup>78</sup> Seeman TE, Singer BH, Ryff CD, Dienberg Love G, Levy-Storrs L (2002) Social relationships, gender, and allostatic load across two age cohorts. *Psychosom. Med.* 64:395–406
- <sup>79</sup> Mason J W (1968) A review of psychoendocrine research on the pituitary-adrenal cortical system. *Psychosomatic Medicine* 30:576–607
- <sup>80</sup> Yehuda R (2002) Post-traumatic stress disorder. *N Engl J Med.* 10;346(2):108–14
- <sup>81</sup> Remer T, Maser-Gluth C, Wudy SA (2008) Glucocorticoid measurements in health and disease-metabolic implications and the potential of 24-h urine analyses. *Mini Rev Med Chem.* 8(2):153–70
- <sup>82</sup> Veerman EC, van den Keybus PA, Vissink A, Nieuw Amerongen AV (1996) Human glandular salivas: their separate collection and analysis. *Eur J Oral Sci.* 104:346–52
- <sup>83</sup> Nemoda Z, Horvat-Gordon M, Fortunato CK, Beltzer EK, Scholl JL, Granger DA (2011) Assessing genetic polymorphisms using DNA extracted from cells present in saliva samples. *BMC Med Res Methodol.* 19;11:170
- <sup>84</sup> Kirschbaum C, Hellhammer DH (1989) Salivary cortisol in psychobiological research: An overview. *Neuropsychobiology* 22:150–169
- <sup>85</sup> Kirschbaum C, Hellhammer DH (1994) Salivary cortisol in psychoneuroendocrine research: Recent developments and applications. *Psychoneuroendocrinology* 19(4):313–333
- <sup>86</sup> Mendel C M (1989) The free hormone hypothesis: A physiologically based mathematical model. *Endocrine Reviews* 10(3):232–274
- <sup>87</sup> Gunnala V, Guo R, Minutti C, Durazo-Arvizu R, Laporte C, Mathews H, Kliethermis S, Bhatia R (2015) Measurement of salivary cortisol level for the diagnosis of critical illness-related corticosteroid insufficiency in children. *Pediatr Crit Care Med*;16(4)
- <sup>88</sup> Vining R F, McGinley R A, Maksvytis J J, Ho K Y (1983) Salivary cortisol: A better measure of adrenal cortical function than serum cortisol. *Annals of Clinical Biochemistry* 20:329–335
- <sup>89</sup> Walker R F (1984) Salivary cortisol determinations in the assessment of adrenal activity. *Frontiers of Oral Physiology* 5:33–50
- <sup>90</sup> Kirschbaum C, Hellhammer DH (2000) Salivary cortisol. In G. Fink (Ed.), *Encyclopedia of stress* (Vol. 3, pp. 379–383). New York: Academic Press
- <sup>91</sup> Kadziola A, Abe J, Svensson B, Haser R (1994) Crystal and molecular structure of barley alpha-amylase. *J. Mol. Biol.* 239 (1)
- <sup>92</sup> Perry GH et al. (2007) Diet and evolution of human amylase gene copy number variation, *Nature Genetics.* 39:1256–1260
- <sup>93</sup> Nater UM, Rohleder N (2009) Salivary alpha-amylase as a non-invasive biomarker for the sympathetic nervous system: current state of research. *Psychoneuroendocrinology* 34(4):486–96
- <sup>94</sup> Nater UM, Rohleder N, Schlotz W, Ehler U, Kirschbaum C (2007) Determinants of the diurnal course of salivary alpha-amylase. *Psychoneuroendocrinology* 32(4):392–401
- <sup>95</sup> Rogers JD, Palmer RJ, Kolenbrander PE, Scannapieco FA (2001) Role of *Streptococcus gordonii* amylase-binding protein A in adhesion to hydroxyapatite, starch metabolism, and biofilm formation. *Infect Immun* 69(11): 7046–56
- <sup>96</sup> Chatterton RT Jr, Vogelsong KM, Lu YC, Ellman AB, Hudgens GA (1996) Salivary alpha-amylase as a measure of endogenous adrenergic activity. *Clin Physiol* 16(4):433–48
- <sup>97</sup> van Stegeren A, Rohleder N, Everaerd W, Wolf OT (2006) Salivary alpha amylase as marker for adrenergic activity during stress: Effect of betablockade. *Psychoneuroendocrinology*, 31(1):137–41
- <sup>98</sup> Rohleder N, Wolf JM, Maldonado EF, Kirschbaum C (2006) The psychosocial stress-induced increase in salivary alpha-amylase is independent of saliva flow rate. *Psychophysiology*, 43(6):645–52
- <sup>99</sup> Bosch JA, Veerman EC, de Geus EJ, Proctor GB (2011)  $\alpha$ -Amylase as a reliable and convenient measure of sympathetic activity: Don't start salivating just yet! *Psychoneuroendocrinology* 36(4):449–53
- <sup>100</sup> Thoma MV, Kirschbaum C, Wolf JM, Rohleder N (2012) Acute stress responses in salivary alpha-amylase predict increases of plasma norepinephrine. *Biol Psychol.* 91(3):342–48
- <sup>101</sup> Segal SK, Cahill L (2009) Endogenous noradrenergic activation and memory for emotional material in men and women. *Psychoneuroendocrinology* 34(9):1263–71

- <sup>102</sup> Susman EJ, Dockray S, Granger DA, Blades KT, Randazzo W, Heaton JA, Dorn LD (2010) Cortisol and alpha amylase reactivity and timing of puberty: Vulnerabilities for antisocial behaviour in young adolescents. *Psychoneuroendocrinology* 35(4):557-69
- <sup>103</sup> Mahon Belmonde P, Zandi PP, Potash JB, Nestadt G, Wand GS (2013) Genetic Association of FKBP5 and CRHR1 with Cortisol Response to Acute Psychosocial Stress in Healthy Adults. *Psychopharmacology* 227(2): 231–241
- <sup>104</sup> Sheikh HI, Kryski KR, Smith HJ, Hayden EP, Singh SM (2013) *Neuroscience* 15:1-11
- <sup>105</sup> Sumner JA, McLaughlin KA, Walsh K, Sheridan MA, Koenen KC (2014) CRHR1 Genotype and History of Maltreatment Predict Cortisol Reactivity to Stress in Adolescents. *Psychoneuroendocrinology* 43:71–80
- <sup>106</sup> Christiaens I, Ang QW, Gordon LN, Fang X, Williams SM, Pennell CE, Olso DM (2015) Two novel genetic variants in the mineralocorticoid receptor gene associated with spontaneous preterm birth. *BMC Medical Genetics* 16:59
- <sup>107</sup> Payne EK (2013) Genetic studies of salivary cortisol profiles and their influence on chronic disease risk factors, doctoral thesis, University of Michigan, Michigan
- <sup>108</sup> Muller M, Baniahmad C, Kaltschmidt C, Renkawitz R (1991) Multiple domains of the glucocorticoid receptor involved in synergism with the CACCC box factor(s). *Mol Endocrinol.* 5(10):1498-503
- <sup>109</sup> Alt SR (2011) The glucocorticoid receptor: transcriptional regulation and epigenetic programming, doctoral thesis, University of Trier, Germany
- <sup>110</sup> Charmandari E, Chrousos GP, Lambrou GI, Pavlaki A, Koide H, Sin Man Ng S, Kino T (2011) Peripheral CLOCK regulates target-tissue glucocorticoid receptor transcriptional activity in a circadian fashion in man. *PLoS ONE* 6(9):1-10
- <sup>111</sup> Bamberger CM, Bamberger AM, de Castro M, Chrousos GP (1995) Glucocorticoid receptor beta, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans. *J. Clin. Invest.* 95:2435-2441
- <sup>112</sup> Hagendorf A, Koper JW, de Jong FH, Brinkmann AO, Lamberts SWJ, Feelders RA (2005) Expression of the human glucocorticoid receptor splice variants alpha, beta, and P in peripheral blood mononuclear leukocytes in healthy controls and in patients with hyper- and hypocortisolism. *J. Clin. Endocr. Metab.* 90:6237-6243
- <sup>113</sup> Wei Q, Lu XY, Liu L, Schafer G, Shieh KR, Burke S, Robinson TE, Watson SJ, Seasholtz AF, Akil H (2004) Glucocorticoid receptor overexpression in forebrain: a mouse model of increased emotional lability. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 101:11851-11856
- <sup>114</sup> Koper JW, Stolk RP, de Lange P, Huizenga NA, Molijn GJ, Pols HA, Grobbee DE, Karl M, de Jong FH, Brinkmann AO, Lamberts SW (1997) Lack of association between five polymorphisms in the human glucocorticoid receptor gene and glucocorticoid resistance. *Hum. Genet.* 99:663-668
- <sup>115</sup> van Rossum EFC, Koper JW, Huizenga NATM, Uitterlinden AG, Janssen JAMJL., Brinkmann AO, Grobbee DE, de Jong FH, van Duyn CM, Pols HAP, Lamberts SWJ (2002) A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene, which decreases sensitivity to glucocorticoids in vivo, is associated with low insulin and cholesterol levels. *Diabetes* 51:3128-3134
- <sup>116</sup> Finken MJJ, Meulenbelt I, Dekker FW, Frolich M, Romijn JA, Slagboom PE, Wit JM (2007) The 23K variant of the R23K polymorphism in the glucocorticoid receptor gene protects against postnatal growth failure and insulin resistance after preterm birth. *J. Clin. Endocr. Metab.* 92:4777-4782
- <sup>117</sup> Galecka E, Szemraj J, Bienkiewicz M, Majsterek I, Przybylowska-Sygut K, Galecki P, Lewiński A (2013) Single nucleotide polymorphisms of NR3C1 gene and recurrent depressive disorder in population of Poland. *Molecular Biology Reports* 40:1693-1699
- <sup>118</sup> Souza MC, Martins CS, Silva IM, Chriguer RS, Bueno AC, Antonini SR, Silva WA, Zago MA, Moreira AC, de Castro M (2014) NR3C1 polymorphisms in Brazilians of Caucasian, African, and Asian ancestry: glucocorticoid sensitivity and genotype association. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia and Metabologia* 58
- <sup>119</sup> Fortier ME, Sengupta SM, Grizenko N, Choudhry Z, Thakur G, Joobar R (2013) Genetic Evidence for the Association of the Hypothalamic–Pituitary–Adrenal (HPA) Axis with ADHD and Methylphenidate Treatment Response *Neuromolecular Medicine* 15:122-132
- <sup>120</sup> Zennaro MC, Souque A, Viengchareun S, Poisson E & Lombes M (2001) A new human MR splice variant is a ligand-independent transactivator modulating corticosteroid action. *Molecular Endocrinology* 15: 1586–1598.
- <sup>121</sup> Alnemri ES, Maksymowych AB, Robertson NM, Litwack G (1991) Overexpression and characterization of the human mineralocorticoid receptor. *J Biol Chem* 266:18072-18081
- <sup>122</sup> Zennaro MC, Keightley MC, Kotelevtsev Y, Conway GS, Soubrier F, Fuller PJ (1995) Human mineralocorticoid receptor genomic structure and identification of expressed isoforms. *J Biol Chem* 270:21016-21020
- <sup>123</sup> Berger S, Wolfer DP, Selbach O, Alter H, Erdmann G, Reichardt HM, Chepkova AN, Welzl H, Haas HL, Lipp HP, Schutz G (2006) Loss of the limbic mineralocorticoid receptor impairs behavioral plasticity. *Proc Nat Acad Sci* 103:195-200



- <sup>124</sup>Ritter AM, Fontana V, Faria AP, Modolo R, Barbaro NR, Sabbatini AR, Peres H, Biagi C, Silva PS, Lopes PC, Tanus-Santos JE, Coelho EB, Moreno H (2016) Association of Mineralocorticoid Receptor Polymorphism I180V With Left Ventricular Hypertrophy in Resistant Hypertension. *The American Journal of Hypertension* 29:245-250
- <sup>125</sup>Luo LQ, Wang LY, He FZ, Sun NL, Tang GF, Wen JG, Luo ZY, Liu ZQ, Zhou HH, Chen XP, Zhang W (2014) Effect of NR3C2 genetic polymorphisms on the blood pressure response to enalapril treatment. *Pharmacogenomics* 15:201-208
- <sup>126</sup>Slof-Op't Landt MC, DeRijk RH, van Son GE, Suchiman HE, Meulenbelt I, Slagboom PE, Van Furth EF (2014) A common mineralocorticoid receptor polymorphism (I180V) interacts with life events in relation to perfectionism in eating disorders: a pilot study. *Eur Eat Disord Rev* 22(6):423-9
- <sup>127</sup>Kortmann GL, Contini V, Bertuzzi GP, Mota NR, Rovaris DL, Paixão-Côrtes VR, de Lima LL, Grevet EH, Salgado CA, Vitola ES, Rohde LA, Belmonte-de-Abreu P, Bau CH (2013) The role of a mineralocorticoid receptor gene functional polymorphism in the symptom dimensions of persistent ADHD. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 263(3):181-188
- <sup>128</sup>DeRijk RH, Wust S, Meijer OC, Zennaro MC, Federenko IS, Hellhammer DH, Giacchetti G, Vreugdenhil E, Zitman FG, de Kloet ER (2006) A common polymorphism in the mineralocorticoid receptor modulates stress responsiveness. *J Clin Endocrinol Metab* 91:5083-5089
- <sup>129</sup>Tyrka AR, Ridout KK, Parade SH, Paquette A, Marsit CJ, Seifer R (2015) Childhood maltreatment and methylation of FK506 binding protein 5 gene (FKBP5). *Development and Psychopathology* 27: 1637-1645
- <sup>130</sup>Sinars CR, Cheung-Flynn J, Rimerman RA, Scammell JG, Smith DF, Clardy J (2003) Structure of the large FK506-binding protein FKBP51, an Hsp90-binding protein and a component of steroid receptor complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(3):868-73
- <sup>131</sup>Cheung-Flynn J, Roberts PJ, Riggs DL, Smith DF (2003) C-terminal sequences outside the tetratricopeptide repeat domain of FKBP51 and FKBP52 cause differential binding to Hsp90. *J Biol Chem* 278(19): 17388-94
- <sup>132</sup>Barent RL, Nair SC, Carr DC, Ruan Y, Rimerman RA, Fulton J, Zhang Y, Smith DF (1998) Analysis of FKBP51/FKBP52 chimeras and mutants for Hsp90 binding and association with progesterone receptor complexes. *Mol Endocrinol* 12(3):342-54
- <sup>133</sup>Pei H, Li L, Fridley BL, Jenkins GD, Kalari KR, Lingle W, Petersen G, Lou Z, Wang L (2009) FKBP51 affects cancer cell response to chemotherapy by negatively regulating Akt. *Cancer Cell* 16(3):259-66
- <sup>134</sup>Ellsworth KA, Wang L (2013) *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology* 18:314-320.
- <sup>135</sup>Lee RS, Tamashiro KL, Yang X, Purcell RH, Huo Y, Rongione M, Potash JB, Wand GS (2011) A measure of glucocorticoid load provided by DNA methylation of Fkbp5 in mice. *Psychopharmacology* 218(1):303-12
- <sup>136</sup>Binder EB, Salyakina D, Lichtner P, Wochnik GM, Ising M, Putz B, Papiol S, Seaman S, Lucae S, Kohli MA, Nickel T, Kunzel HE, Fuchs B, Majer M, Pfennig A, Kern N, Brunner J, Modell S, Baghai T, Deiml T, Zill P, Bondy B, Rupprecht R, Messer T, Kohnlein O, Dabitz H, Bruckl T, Muller N, Pfister H, Lieb R, Mueller JC, Lohmussaar E, Strom TM, Bettecken T, Meitinger T, Uhr M, Rein T, Holsboer F, Muller-Myhsok B (2004) Polymorphisms in FKBP5 are associated with increased recurrence of depressive episodes and rapid response to antidepressant treatment. *Nat Genet* 36(12):1319-25
- <sup>137</sup>Stamm TJ, Rampp C, Wiethoff K, Stingl J, Mössner R, Malley GO, Ricken R, Seemüller F, Keck M, Fisher R, Gaebel W, Maier W, Möller HJ, Bauer M, Adli M (2016) The FKBP5 polymorphism rs1360780 influences the effect of an algorithm-based antidepressant treatment and is associated with remission in patients with major depression. *Journal of Psychopharmacology* 30:40-47
- <sup>138</sup>Tozzi L, Carballedo A, Wetterling D, McCarthy H, O'Keane V, Gill M, Morris D, Fahey C, Meaney J, Frodl T (2016) Single-Nucleotide Polymorphism of the FKBP5 Gene and Childhood Maltreatment as Predictors of Structural Changes in Brain Areas Involved in Emotional Processing in Depression, *Neuropsychopharmacology* 41:487-497
- <sup>139</sup>Nemoda Z, Szekely A, Sasvari-Szekely M (2011) Psychopathological aspects of dopaminergic gene polymorphisms in adolescence and young adulthood. *Neurosci Biobehav Rev* 35:1665-1686
- <sup>140</sup>Kish L. (1965) *Survey sampling*. New York: Wiley
- <sup>141</sup>NHANES. National Health and Nutrition Examination Survey Anthropometry Procedures Manual. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention, 2007.
- <sup>142</sup>ESH and ESC. The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). Guidelines for Management of Arterial Hypertension. *Eur Heart J* 2007;28:1462-1563
- <sup>143</sup>Seiffge-Krenke I. Problem Questionnaire (PQ) and Coping Across Situations Questionnaire (CASQ). English version. Mainz: Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 2008.
- <sup>144</sup>Granger DA, Fortunato CK, Beltzer EK, Virag M, Bright MA, Out, D (2012) Focus on methodology: salivary bioscience and research on adolescence: an integrated perspective. *J Adolesc* 35:1081-1095

- <sup>145</sup> Granger DA, Hibbel LC, Fortunato CK, Kapelewski CH (2009) Medication effects on salivary cortisol: tactics and strategy to minimize impact in behavioral and developmental science. *Psychoneuroendocrinology* 34:1437–1448
- <sup>146</sup> Sreebny LM, Schwartz SS (1997) A reference guide to drugs and dry mouth. *Gerodontology* 14:33–47, 2nd edition
- <sup>147</sup> Kudielka BM, Hellhammer DH, Wüst S (2009) Why do we respond so differently? Reviewing determinants of human salivary cortisol responses to challenge. *Psychoneuroendocrinology* 34:2–18
- <sup>148</sup> Nicolson NA (2008) Measurement of Cortisol. *Handbook of physiological research methods in health psychology* 3:37–74
- <sup>149</sup> Zhang T, Ramakrishnan R, Livny M (1996) BIRCH: An efficient data clustering method for very large databases. *Proceedings of the ACM SIGMOD Conference on Management of Data*. Montreal, Canada.
- <sup>150</sup> Court MH, Michael H (2012) Court's (2005–2008) online calculator, <https://www.tufts.edu/>
- <sup>151</sup> Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MAR, Bender D, Maller J, Sklar P, de Bakker PIW, Daly MJ, Sham PC (2007) PLINK: a toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis. *American Journal of Human Genetics*: 81.
- <sup>152</sup> Stefan Wust1, Jutta Wolf1, Dirk H Hellhammer1, Ilona Federenko1, Nicole Schommer1, Clemens Kirschbaum The cortisol awakening response - normal values and confounds *Noise Health*. 2000;2(7):79-88
- <sup>153</sup> Adair LS, Kuzawa CW, Borja (2001) Maternal energy stores and diet composition during pregnancy program adolescent blood pressure. *Circulation* 104:1034–1039
- <sup>154</sup> Cohen S, Schwartz JE, Epel E, Kirschbaum C, Sidney S, Seeman T (2006) Socioeconomic status, race, and diurnal cortisol decline in the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) Study. *Psychosom. Med* 68:41–50
- <sup>155</sup> Almeida DM, Savla J, Stawski RS, Banks SR (2007) Into the field and under the skin: measurement quality of salivary cortisol in the National Study of Daily Experiences. In: *International Society of Psychoneuroendocrinology Annual Conference*, Madison, WI.
- <sup>156</sup> Tucker Halpern C, Whitsel EA, Wagner B, Mullan Harris K (2012) Challenges of Measuring Diurnal Cortisol Concentrations in a Large Population-Based Field Study. *Psychoneuroendocrinology* 37(4):499–508
- <sup>157</sup> Kroenke K, Spitzer RL (1998) Gender differences in the reporting of physical and somatoform symptoms. *Psychosom Med* 60(2):150–5
- <sup>158</sup> Troisi A (2001) Gender differences in vulnerability to social stress: a Darwinian perspective. *Physiology and behavior* 73:443–49
- <sup>159</sup> Earle TL, Linden W, Weinberg J (1999) Differential effects of harassment on cardiovascular and salivary cortisol stress reactivity and recovery in women and men. *J Psychosom Res* 46:125–141
- <sup>160</sup> Stroud LR, Salovey P, Epel ES (2002) Sex differences in stress responses: social rejection versus achievement stress. *Biol Psychiatry* 52(4):318–27
- <sup>161</sup> Bouma EMC, Riese H, Ormel J, Verhulst FC, Oldehinkel AJ (2009) Adolescents' cortisol responses to awakening and social stress: Effects of gender, menstrual phase and oral contraceptives. The TRAILS study. *Psychoneuroendocrinology* 34:884–93
- <sup>162</sup> Hoyt LT, Craske MG, Mineka S, Adam EK (2015) Positive and Negative Affect and Arousal: Cross-Sectional and Longitudinal Associations with Adolescent Cortisol Diurnal Rhythms. *Psychosom Med* 77(4):392–401
- <sup>163</sup> Kudielka B, Buske-Kirschbaum A, Hellhammer D, Kirschbaum C (2004) HPA axis responses to laboratory psychosocial stress in healthy elderly adults, younger adults, and children: Impact of age and gender. *Psychoneuroendocrinology* 29:83–98
- <sup>164</sup> Herman JP, Culligan WE (1997) Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci* 20:78–84
- <sup>165</sup> Witzemann TM, Pardue ML (2001) Exploring the biological contribution to human health. In *Does Sex Matter?* National Academy Press. Washington, DC.
- <sup>166</sup> Wingenfeld K, Spitzer C, Rullkötter N, Löwe B (2010) Borderline personality disorder: hypothalamus pituitary adrenal axis and findings from neuroimaging studies. *Psychoneuroendocrinology* 35:154–170
- <sup>167</sup> Shirtcliff EA, Allison AL, Armstrong JM, Slaterry MJ, Kalin NH, Essex MJ (2012) Longitudinal Stability and Developmental Properties of Salivary Cortisol Levels and Circadian Rhythms from Childhood to Adolescence. *Dev Psychobiol* 54(5):493–502
- <sup>168</sup> Pasquali R (2012) The hypothalamic–pituitary–adrenal axis and sex hormones in chronic stress and obesity: pathophysiological and clinical aspects. *Ann N Y Acad Sci* 1264(1):20–35
- <sup>169</sup> Platje E, Vermeiren RR, Branje SJ, Doreleijers TA, Meeus WH, Koot HM, Frijns T, van Lier PA, Jansen LM (2013) Long-term stability of the cortisol awakening response over adolescence. *Psychoneuroendocrinology* 38(2):271–80

- <sup>170</sup> Rosmalen JG, Oldehinkel AJ, Ormel J, de Winter AF, Buitelaar JK, Verhulst FC (2005) Determinants of salivary cortisol levels in 10–12 year old children; a population-based study of individual differences. *Psychoneuroendocrinology* 30:483–495
- <sup>171</sup> Gunnar MR, Vazquez D (2006) Stress neurobiology and developmental psychopathology. *Developmental Psychopathology: Developmental Neuroscience* 2:533–577
- <sup>172</sup> Tsang AH, Barclay JL, Oster H (2014) Interactions between endocrine and circadian systems. *Journal of Molecular Endocrinology* 52(1):1–16
- <sup>173</sup> Carroll T, Findling J (2010) The diagnosis of Cushing's syndrome. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 11:147–153
- <sup>174</sup> Mitchell AL, Pearce SHS (2012) Autoimmune Addison disease: pathophysiology and genetic complexity. *Nature Reviews Endocrinology* 8:306–316
- <sup>175</sup> Nater UM (2004) The Role of Salivary Alpha-Amylase in Stress Research. Cuvillier, Göttingen
- <sup>176</sup> Takai N, Yamaguchi M, Aragaki T, Eto K, Uchihashi K, et al. (2007) Gender-specific differences in salivary biomarker responses to acute psychological stress. *Ann N Y Acad Sci* 1098:510–515
- <sup>177</sup> Maruyama Y, Kawano A, Okamoto S, Ando T, Ishitobi Y, Tanaka Y, Inoue A, Imanaga J, Kanehisa M, Higuma H, Ninomiya T, Tsuru J, Hanada H, Akiyoshi J (2012) Differences in Salivary Alpha-Amylase and Cortisol Responsiveness following Exposure to Electrical Stimulation versus the Trier Social Stress Tests. *PlosOne* 7(7): 1–10
- <sup>178</sup> Wolf JM, Nicholls E, Chen E (2008) Chronic stress, salivary cortisol, and  $\alpha$ -amylase in children with asthma and healthy children. *Biological Psychology* 78(1):20–28
- <sup>179</sup> Koh D, Ng V, Naing L (2014) Alpha Amylase as a Salivary Biomarker of Acute Stress of Venepuncture from Periodic Medical Examinations. *Front Public Health* 2:121
- <sup>180</sup> Wilhelm I, Born J, Kudiella BM, Schlotz W, Wüst S (2007) Is the cortisol awakening rise a response to awakening? *Psychoneuroendocrine* 32:358–366
- <sup>181</sup> Edwards S, Evans P, Hucklebridge F, Clow A (2001) Association between time of awakening and diurnal cortisol secretory activity. *Psychoneuroendocrinology* 26(6):613–622
- <sup>182</sup> Kudiella BM, Kirschbaum C (2003) Awakening cortisol responses are influenced by health status and awakening time but not by menstrual cycle phase. *Psychoneuroendocrinology* 28(1):35–47
- <sup>183</sup> Stalder T, Hucklebridge F, Evans P, Clow A (2009) Use of a single case study design to examine state variation in the cortisol awakening response: relationship with time of awakening. *Psychoneuroendocrinology* 34(4):607–614
- <sup>184</sup> Powell DJ, Schlotz W (2012) Daily Life Stress and the Cortisol Awakening Response: Testing the Anticipation Hypothesis. *PLoS ONE* 7(12)
- <sup>185</sup> Stalder T, Evans P, Hucklebridge F, Clow A (2010b) Associations between psychosocial state variables and the cortisol awakening response in a single case study. *Psychoneuroendocrinology* 35:209–14
- <sup>186</sup> Zoccola PM, Dickerson SS, Yim IS (2011) Trait and state perseverative cognition and the cortisol awakening response. *Psychoneuroendocrinology* 36(4):592–595
- <sup>187</sup> Dettenborn L, Rosenlocher F, Kirschbaum C (2007) No effects of repeated forced wakings during three consecutive nights on morning cortisol awakening responses (CAR): a preliminary study. *Psychoneuroendocrinology* 32:915–21
- <sup>188</sup> Zeiders KH, Doane LD, Adam EK (2011) Reciprocal relations between objectively measured sleep patterns and diurnal cortisol rhythms in late adolescence. *J Adolesc Health* 48:566–71
- <sup>189</sup> Kumari M, Badrick E, Ferrie J, Perski A, Marmot M, Chandola T (2009) Self-reported sleep duration and sleep disturbance are independently associated with cortisol secretion in the Whitehall II study. *J Clin Endocrinol Metab* 94:4801–9
- <sup>190</sup> McHale SM, Blocklin MK, Walter KN, Davis KD, Almeida DM, Klein LC (2012) The Role of Daily Activities in Youths' Stress Physiology. *J Adolesc Health* 51(6): 623–628
- <sup>191</sup> Suglia S, Staudenmayer J, Cohen S, Wright R (2010) Posttraumatic stress symptoms related to community violence and children's diurnal cortisol response in an urban community dwelling sample. *International Journal of Behavioral Medicine* 17:43–50
- <sup>192</sup> Phuong Do D, Diez Roux AV, Hajat A, Auchincloss A, Merkin S, Ranjit N, Sheam S, Seeman T (2011) Circadian rhythm of cortisol and neighborhood characteristics in a population-based sample: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Health Place* 17(2):625–632
- <sup>193</sup> Pruessner M, Hellhammer DH, Pruessner JC, Lupien SJ (2003) Self-reported depressive symptoms and stress levels in healthy young men: associations with the cortisol response to awakening. *Psychosom Med* 65(1): 92–9
- <sup>194</sup> Per E Gustafsson, Per A Gustafsson, Nelson N (2006) Cortisol levels and psychosocial factors in preadolescent children. *Stress and Health* 22:3–9
- <sup>195</sup> Polka DE, Cohena S, Doyleb WJ, Skoner DP, Kirschbaum C (2005) State and trait affect as predictors of salivary cortisol in healthy adults. *Psychoneuroendocrinology* 30:261–272

- <sup>196</sup>He Z, Payne EK, Mukherjee B, Lee S, Smith JA, Ware EB, Sánchez BN, Seeman TE, Kardina SLR, Diez Roux AV (2015) Association between Stress Response Genes and Features of Diurnal Cortisol Curves in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis: A New Multi-Phenotype Approach for Gene-Based Association Tests. *PLOS ONE*:1-15
- <sup>197</sup>Golden SH, Sánchez BN, Wu M, Champaneri S, Diez Roux AV, Seeman T, Wand GS (2013) Relationship between the cortisol awakening response and other features of the diurnal cortisol rhythm: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Psychoneuroendocrinology* 38(11):2720-8
- <sup>198</sup>Lederbogen F, Kuhner C, Kirschbaum C, Meisinger C, Lammich J, Holle R, Krumm B, von Lengerke T, Wichmann HE, Deuschle M, Ladwig KH (2010) Salivary cortisol in a middle-aged community sample: results from 990 men and women of the KORA-F3 Augsburg study. *European Journal of Endocrinology* 163: 443–451
- <sup>199</sup>Miller GE, Chen E, Zhou ES (2007) If It Goes Up, Must It Come Down? Chronic Stress and the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Axis in Humans. *Psychological Bulletin* 133(1):25-45
- <sup>200</sup>Nater UM, La Marca R, Florin L, Moses A, Langhans W, Koller MM, Ehlert U (2006) Stress-induced changes in human salivary alpha-amylase activity-associations with adrenergic activity. *Psychoneuroendocrinology* 31: 49–58
- <sup>201</sup>Šupe-Domić D, Milas G, Drmić Hofman I, Rumora L, Martinović Klarić I (2016) Daily salivary cortisol profile: Insights from the Croatian Late Adolescence Stress Study (CLASS). *Biochemia Medica* 26(3):408–20
- <sup>202</sup>Weitzman ED, Fukushima D, Nogeire C, Roffwarg H, Gallagher TF, Hellman L (1971) Twenty-four hour pattern of the episodic secretion of cortisol in normal subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 33:14-22
- <sup>203</sup>Michels N, Sioen I, De Vriendt T, Huybrechts I, Vanaelst B, De Henauw S (2011) Children's Morning and Evening Salivary Cortisol: Pattern, Instruction Compliance and Sampling Confounders. *Hormone research in paediatrics* 1-8
- <sup>204</sup>Juster RP, McEwen BS, Lupien SJ (2010) Allostatic load biomarkers of chronic stress and impact on health and cognition. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 35:2–16
- <sup>205</sup>Miller R, Stalder T, Jarczok M, Almeida DM, Badrick E, Bartels M, Boomsma DI, Coe CL, Dekker MCJ, Donzella B, Fischer JE, Gunnar MR, Kumari M, Lederbogen F, Oldehinkel AJ, Power C, Rosmalen JG, Ryff CD, Subramanian SV, Tiemeier H, Watamura SE, Kirschbaum C (2016) The CIRCORT database: Reference ranges and seasonal changes in diurnal salivary cortisol derived from a meta-dataset comprised of 15 field studies. *Psychoneuroendocrinology* 73:16–23
- <sup>206</sup>Dodig S Imunokemija. Medicinska naklada 2014.
- <sup>207</sup>Gelhaar T, Seiffge-Krenke I, Borge A, Cicognani E, Cunha M, Lončarić D, Macek P, Steinhausen HC, Metzke CW (2007) Adolescent Coping with Everyday Stressors: A Seven Nation-Study with Youth from Central, Eastern, Southern and Northern Europe. *European Journal of Developmental Psychology* 4:129–156
- <sup>208</sup>Seiffge-Krenke I, Persike M, Chau C, Hendry LB, Kloepp M, Terzini-Hollar M, Tam V, Rodriguez Naranjo C, Herrera D, Menna P, Rohail I, Veisson M, Hoareau E, Luwe M, Loncaric D, Han H, Regusch L (2012) Differences in agency? How adolescents from 18 countries perceive and cope with their futures. *International Journal of Behavioral Development* 36:258–270
- <sup>209</sup>Eurostat. (2015). Unemployment statistics. Available at: [http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Unemployment\\_statistics](http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Unemployment_statistics)
- <sup>210</sup>Seiffge-Krenke I, Aunola K, Nurmi JE (2009) Changes in Stress Perception and Coping During Adolescence: The Role of Situational and Personal Factors. *Child Development* 80(1): 259 – 279
- <sup>211</sup>Seiffge-Krenke I (1995) Stress, coping and relationships in adolescence. Hillsdale, New York: Lawrence Erlbaum
- <sup>212</sup>Bortoluzzi A, Blaya C, da Rosa ED, Paim M, Rosa V, Leistner-Segal S, Manfro GG (2015) What can HPA axis- linked genes tell us about anxiety disorders in adolescents? *Trends Psychiatry Psychother* 37(4):232-7
- <sup>213</sup>DeRijk RH (2009) Single Nucleotide Polymorphisms Related to HPA Axis Reactivity. *Neuroimmunomodulation* 16:340–352
- <sup>214</sup>Brummett BH, Kuhn CM, Boyle SH, Babyak MA, Siegler IC, Williams RB (2012) Cortisol responses to emotional stress in men: Association with a functional polymorphism in the 5HTR2C Gene. *Biol Psychol* 89(1): 94–98
- <sup>215</sup>Miller R, Wankerl M, Stalder T, Kirschbaum C, Alexander N (2013) The serotonin transporter gene-linked polymorphic region (5-HTTLPR) and cortisol stress reactivity: a meta-analysis. *Molecular Psychiatry* 18:1018-1024
- <sup>216</sup>Waya BM, Brownb KW, Quagliab J, McCainc N, Taylord SE (2016) Nonsynonymous HTR2C polymorphism predicts cortisol response to psychosocial stress II: Evidence from two samples. *Psychoneuroendocrinology* 70:142–151
- <sup>217</sup>de Kloet ER, Otte C, Kumsta R, Kok L, Hillegers MH, Hasselmann H, Kliegel D, Joëls M (2016) Stress and depression a crucial role of the mineralocorticoid receptor. *J Neuroendocrinol* 28(8)

- 
- <sup>218</sup> Bouma EMC, Riese H, Nolte IM, Oosterom E, Verhulst FC, Ormel J, Oldehinkel AJ (2011) No Associations Between Single Nucleotide Polymorphisms in Corticoid Receptor Genes and Heart Rate and Cortisol Responses to a Standardized Social Stress Test in Adolescents: The TRAILS Study. *Behav Genet* 41(2):253–261
- <sup>219</sup> Koper JW, Stolk RP, De Lange P, Huizenga NATM, Molijn GJ, Pols HAP, Grobbee D, Karl M, de Jong FH, Brinkmann AO, Lamberts SWJ (1997) Lack of association between five polymorphisms in the human glucocorticoid receptor gene and glucocorticoid resistance. *Human Genetics* 99(5):663–668
- <sup>220</sup> Wester VL, Koper JW, van den Akker EL, Franco OH, Stolk RP, van Rossum EF (2016) Glucocorticoid receptor haplotype and metabolic syndrome: the Lifelines cohort study. *Eur J Endocrinol* 175(6):645–651
- <sup>221</sup> Fujii T, Ota M, Hori H, Hattori K, Teraishi T, Matsuo J, Kinoshita Y, Ishida I, Nagashima A, Kunugi H (2014) The common functional FKBP5 variant rs1360780 is associated with altered cognitive function in aged individuals. *Sci Rep* 4: 6696
- <sup>222</sup> Scheuer S, Ising M, Uhr M, Otto Y, von Klitzing K, Klein AM (2016) FKBP5 polymorphisms moderate the influence of adverse life events on the risk of anxiety and depressive disorders in preschool children. *J Psychiatr Res* 72:30–6
- <sup>223</sup> Isaksson J, Allen M, Nilsson KW, Lindblad F (2015) Polymorphisms in the FK506 binding protein 5 gene are associated with attention deficit hyperactivity disorder and diurnal cortisol levels. *Acta Paediatr* 104(9):910–5

## 8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 15. veljače 1972. godine u Kninu. Osnovnu školu te Kemijski srednjoškolski centar polazila sam u Splitu. Godine 1990. upisala sam Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, gdje sam 1996. godine diplomirala i stekla naslov diplomiranog inženjera medicinske biokemije. Poslijediplomski doktorski studij na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu, smjer Medicinska biokemija upisala sam 2003. godine.

Tijekom 1997. i 1998. godine odradila sam pripravnički staž u Kliničkom bolničkom centru Split na Odjelu za medicinsko-laboratorijsku dijagnostiku. Godine 1998. položila sam državni ispit pri Ministarstvu zdravstva i socijalne skrbi stekavši dozvolu za samostalan rad te od iste godine radim u KBC Split. Specijalistički ispit iz medicinske biokemije položila sam 2007. godine. Od 2014. godine do danas sam voditelj Odjela za biokemiju na Zavodu za medicinsko-laboratorijsku dijagnostiku KBC Split. Od 2009. godine, kao vanjski suradnik, sudjelujem u nastavi na Medicinskom fakultetu u Splitu, na Katedri za medicinsku kemiju i

---

biokemiju i na preddiplomskom sveučilišnom studijskom programu Medicinsko laboratorijske dijagnostike te diplomskom sveučilišnom studijskom programu Sestrinstva na Sveučilišnom odjelu zdravstvenih studija Sveučilišta u Splitu. Godine 2014. godine izabrana sam u naslovno nastavno zvanje predavača za područje Biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana medicinska biokemija na Sveučilišnom odjelu zdravstvenih studija Sveučilišta u Splitu. Od 2014. godine sam voditelj Katedre za medicinsko-laboratorijsku dijagnostiku, a od 2016. godine na istom Odjelu pomoćnica sam pročelnika za nastavu.

Aktivni sam član Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu i Hrvatske komore medicinskih biokemičara.

Publicirala sam, kao autor ili koautor više znanstvenih i stručnih radova. Sudjelovala sam na brojnim međunarodnim i domaćim znanstvenim skupovima.

Suradnik sam na znanstveno-istraživačkom projektu „Modernizacijski stres, mladi i migracije“ Hrvatske zaklade za znanost (09.01/408).

#### **Popis znanstvenih članaka:**

1. D. Šupe-Domić, G. Milas, I. Drmić Hofman, L. Rumora, I. Martinović Klarić. Daily salivary cortisol profile: Insights from the Croatian Late Adolescence Stress Study (CLASS). *Biochem Med* 26(3):408-420, 2016.
2. J. Božić, T. Galić, D. Šupe-Domić, N. Ivković, T. Tičinović Kurir, Z. Valić, J. Leško, Z. Dogaš. Morning cortisol levels and glucose metabolism parameters in moderate and severe obstructive sleep apnea patients. *Endocrine* 53(3):730-9, 2016.
3. I. Pleština-Borjan, D. Katušić, M. Medvidović-Grubišić, D. Šupe-Domić, K. Bućan, L. Tandara, V. Rogošić. Association of age-related macular degeneration with erythrocyte antioxidant enzymes activity and serum total antioxidant status. *Oxid Med Cell Longev* 2015: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/804054>.
4. J. Meštrović, I. Drmić Hofman, Z. Pogorelić, K. Vilović, D. Šupe-Domić, A. Šešelja-Perišin, V. Čapkun. Beneficial Effect of Nifedipine on Testicular Torsion-detorsion Injury in Rats. *Urology* 84(5):1194-1198, 2014.
5. D. Lasić, B. Uglešić, M. Žuljan Cvitanović, D. Šupe-Domić, L. Uglešić. False-positive methadone urine drug screen in the patient treated with quetiapine. *Acta Clin Croat* 51(2):269-272, 2012.

---

6. M. Hadžija, D. Šupe, L. Rumora, E. Pape-Medvidović, I. Pavić-Renar, Ž. Metelko, M. Slijepčević. Toxicity of sera from type II diabetes mellitus on pancreatic islet cells. Period Biol 97(4):313-316, 1995.

**Poglavlje u sveučilišnom udžbeniku:**

Šupe-Domić, Daniela; Petrić Miše, Branka. Onkološke bolesti – tumorski biljezi. //Medicinska biokemija i laboratorijska medicina u kliničkoj praksi. / Elizabeta Topić, Drago Primorac, Stipan Janković. 2. izd. Zagreb: Medicinska naklada, u tisku. Str. 841-873.

## **TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Doktorski rad

### **SALIVARNI BILJEZI STRESA U POPULACIJI MATURANATA**

**Daniela Šupe-Domić**

#### **SAŽETAK**

U fiziološkom odgovoru na stres i kontroli stresnog odgovora uglavnom sudjeluju dvije komponente neuroendokrinog sustava, simpatičko-medularna (SAM) os, koja regulira prvi odgovor na stres i os hipotalamus-adenohipofiza-kora nadbubrežne žlijezde (HPAC), čija se aktivacija uočava 15 do 20 minuta nakon stresnog podražaja. Cilj ovog istraživanja bilo je ispitati bazalnu, fiziološku aktivnost SAM i HPAC osi te njihovu povezanost s nizom kovarijabli (spol, tip škole, turnus pohađanja nastave, ritam spavanja i budnosti te demografska, akademska i društvena obilježja) u zdravih učenika koji pohađaju završne razrede srednjih škola. Specifični ciljevi uključivali su ispitivanje koncentracije kortizola i aktivnosti alfa-amilaze kao salivarnih biljega odgovora na stres te istraživanje njihove povezanosti sa subjektivnim procjenama razine stresa i sa strategijama suočavanja sa stresom, kao i s polimorfizmima jednog nukleotida (SNP) gena za mineralokortikoidni i glukokortikoidni receptor (rs5522, rs6189, rs6190) te za vezni protein 5 za FK506 (rs1360780). U istraživanje su bila uključena 903 maturanta gimnazija i strukovnih škola iz četiri najveća grada u Hrvatskoj (Zagreb, Split,

Rijeka i Osijek). Uzorci sline prikupljeni kod kuće, tijekom jednog radnog dana u tri vremenske točke (po buđenju, 30 do 45 minuta nakon buđenja i neposredno prije lijeganja), uzeti su za analizu koncentracija kortizola dok se aktivnost alfa-amilaze mjerila samo u jednom uzorku, neposredno po buđenju. Kako bi se ispitaio cirkadijalni ritam lučenja kortizola analizirani su i indeksi lučenja kortizola (CAR, DCD, AUC<sub>G</sub>). Učenice su imale statistički značajno veće koncentracije kortizola u jutarnjim satima, dok se koncentracije kortizola neposredno prije lijeganja nisu razlikovale među spolovima. Učenice imaju različite obrasce priprema za izazove koji ih očekuju tijekom nadolazećeg dana u odnosu na učenike, imaju značajno viši CAR, izraženiji DCD, veći AUC<sub>G</sub> u odnosu na učenike koji su imali statistički značajno veću aktivnost alfa-amilaze. Turnus pohađanja nastave, koji svakako posljedično utječe na ritam spavanja i trajanje budnosti, pokazao se kao prediktor lučenja kortizola. Statistički značajne razlike većine varijabli kortizola potvrđene su između učenika koji pohađaju različite turnuse nastave (SCC<sub>30-45</sub>, CAR, DCD i AUC<sub>G</sub>). Učenici koji su se budili ranije i imali duže trajanje budnosti imali su veći CAR, niži DCD i veći AUC<sub>G</sub>. Nisu potvrđene statistički značajne razlike niti jedne ispitivane varijable u učenika koji pohađaju različite tipove škola (gimnazije vs. strukovne škole). Također, statistički značajne razlike između učenika i učenica bile su uočene i u subjektivnoj procjeni stresa, suočavanju te njihovoj povezanosti s koncentracijama i indeksima kortizola. Zabrinutost za budućnost su oba spola procijenila kao najstresniju domenu života, dok su učenice imale statistički značajno veću razinu ukupnog stresa u odnosu na učenike te su više koristile aktivno suočavanje sa stresom. U ovom su istraživanju pronađene statistički značajne razlike povezanosti alela G polimorfizma rs 5522 s višom koncentracijom kortizola po buđenju (P=0,036), nižim CAR-om (P=0,021), dok je povezanost s DCD-om bila granična (P=0,050). Može se pretpostaviti kako učenici s dokazanim alelom G imaju niži CAR te zbog toga pokazuju lošiju pripremljenost za stresne izazove u nadolazećem danu, unatoč nešto izraženijim vrijednostima DCD-a. Ovo istraživanje ukazuje na potrebu definiranja protokola prikupljanja uzoraka sline u nekliničkim uvjetima i metodoloških smjernica za populacijska istraživanja, ponajprije zbog postojanja niza kovarijabli koje utječu na mjerenje koncentracije kortizola i aktivnosti alfa-amilaze. Dobiveni rezultati doprinose saznanjima o spolnim razlikama u funkciji HPAC osi, koje bi se trebale primijeniti i tijekom provedbe preventivnih mjera u adolescenata te ranijeg otkrivanja skupina koje su posebno osjetljive na stresne poticaje.

Rad je pohranjen u Centralnoj knjižnici Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Rad sadrži: 136 stranice, 18 slika, 30 tablica i 225 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: salivarni kortizol, salivarna alfa-amilaza, psihosocijalni stresni poticaji, rs5522, rs6189, rs6190, rs1360780

Mentori: prof. dr. sc. Irena Drmić Hofman i prof. dr. sc. Lada Rumora

Ocjenjivači: prof. dr. sc. Tihana Žanić Grubišić, izv. prof. dr. sc. Maja Radman i prof. dr. sc. Gordan Lauc

Rad prihvaćen: 17. svibnja 2017.g.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Doctoral thesis

### SALIVARY MARKERS OF STRESS IN UPPER SECONDARY SCHOOL SENIORS

Daniela Šupe-Domić

#### SUMMARY

Physiological response to stress and the control of the stress response is mediated by two major components of the neuroendocrinological systems, sympathetic nervous (SAM) system and hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. In the stress response, the SAM axis is first activated. About fifteen to twenty minutes following the SAM activation, the HPA axis is activated. The aim of the study was to examine basal, physiologically activity of the SAM and HPAC axis activity and to determine associations of various covariates (gender, school type, school shift, sleep-wake rhythm, demographic, academic and life style characteristics) with altered daily salivary cortisol profiles in healthy students attending finishing grades of secondary schools. Specific aims of the study were to analyse concentration of cortisol and activity of alpha- amylase, as salivary markers of stress reaction, to determine association of salivary markers of stress with stress perception and coping, and to determine



---

associations of salivary markers of stress with single nucleotide polymorphisms (SNP) in the genes for the mineralocorticoid and glucocorticoid receptors (rs5522, rs6189, rs6190) and FK506 binding protein 5 (rs1360780). The study included 903 secondary school students enrolled in the finishing classes of gymnasiums and vocational schools from the four largest cities in Croatia (Zagreb, Split, Rijeka and Osijek). The saliva samples were collected at students' homes, over the course of one weekday. Salivary cortisol was sampled at three time points: at awakening, 30 to 45 after wakening and at bedtime. Salivary alpha-amylase was sampled at awakening. In order to analyse the circadian rhythm of salivary cortisol secretion, three indexes were analysed (CAR, DCD and AUC<sub>G</sub>). Females had higher morning concentrations of salivary cortisol than males, whereas bedtime cortisol concentrations were not different in females and males. Females had different salivary cortisol profile and different mechanisms for preparing for the anticipated stress of the upcoming day, higher CAR, steeper DCD and larger AUC<sub>G</sub> than males. On the other side, males had higher activity of salivary alpha-amylase. School shift, and therefore the sleep-wake up rhythm, was an important predictor of the secretion of salivary cortisol. There were statistically significant differences in two school shifts with respect to the majority of salivary cortisol measures (SCC<sub>30-45</sub>, CAR, DCD and AUC<sub>G</sub>). Students who woke-up earlier and were longer awake had larger CAR, flatter DCD and larger AUC<sub>G</sub>. Students from two types of schools (gymnasiums vs. vocational schools) did not differ in any of the measured salivary variables. Furthermore, female and male students differed significantly in stress perception, coping and associations between stress perception, coping and salivary cortisol concentrations and indexes. Future was rated as the most stressful problem domain in both sexes. The perception of total stress was higher in females than males, and females used more active coping than males. Finally, we found statistically significant differences in associations between G allele of rs 5522 polymorphism and higher cortisol concentration at awakening (P=0.036), lower CAR (P=0.021) and higher DCD (P=0.050), but at borderline. It can be hypothesized that the G allele is associated with the lower CAR and therefore, decreased ability of preparing for the anticipated stress (despite borderline association with the steeper DCD). This study points to the need for defining the protocol for salivary sampling in non-clinical conditions and developing methodological guidelines for population-based research, primarily due to the number of co-variables that affect the concentration of salivary cortisol and the activity of salivary alpha-amylase. Obtained results contribute to better understanding of sex differences in the functioning of the HPA axis, which should be considered in the prevention of various psychopathological conditions in adolescence and used for earlier identification of vulnerable groups at high risk of stress-related health problems.

The thesis is deposited in the Central Library of Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 136 pages, 18 figures, 30 tables and 225 references. Original is in Croatian language.

Keywords: salivary cortisol, salivary alpha-amylase, psychosocial stressors, rs5522, rs6189, rs6190, rs1360780

Mentors: Full Professor Irena Drmić Hofman, Ph.D. and Full Professor Lada Rumora, Ph.D.

Reviewers: Full Professor Tihana Žanić Grubišić, Ph.D., Associate Professor Maja Radman, Ph.D. and Full Professor Gordan Lauc, Ph.D.

Thesis accepted: 17<sup>th</sup> May 2017.